

Bakteriozine
in der Gattung Providencia

Josef Schötz

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0100

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. F. Deinhardt

Bakteriozine in der Gattung Providencia

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Josef Schötz

aus

München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Bauernfeind

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Deinhardt

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.1.1982



G l i e d e r u n g

	Seite:
1. EINLEITENDE ÜBERSICHT	1
1.1. Systematische Stellung, biochemische Klassifizierung	2
1.2. Klinische Bedeutung und Antibiotikaresistenz...	6
1.3. Übergangswege und Epidemiologie	10
1.4. Was sind Bakteriozine ?	13
1.5. Vorkommen und Verwendung der Bakteriozine	16
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. Material	18
2.1.1. Stämme	18
2.1.2. Geräte	21
2.1.3. Nährmedien, Antibiotika	22
2.2. Methoden	23
2.2.1. Isolieren und Identifizieren von Providencia- stämmen aus Abwasser	23
2.2.2. Biochemisches Klassifizieren mit Api 20E	24
2.2.3. Prüfung auf Bakteriozinsynthese und -sensi- tivität	24
2.2.3.1. Die manuelle Radialstrichmethode	24
2.2.3.2. Die teilmechanisierte Radialstrichmethode	29
2.2.4. Ausschluß von Bakteriophagen	31
3. ERGEBNISSE	32
3.1. Isolierung von Providenciastämmen aus Abwasser	32
3.2. Biochemische Charakterisierung der Stämme	32
3.3. Mitomycinresistenz der Stämme und Wahl der Mitomycinkonzentration	34
3.4. Testung der Providenciastämme auf Bakteriozin- bildung und -empfindlichkeit	36

3.4.1.	Testung von 73 Stämmen gegeneinander als Producer und Indikatoren	36
3.4.2.	Testung der übrigen Providenciastämme gegen die gefundenen Indikatoren	37
3.5.	Reproduzierbarkeit	44
3.6.	Ausschluß von Bakteriophagen	46
3.7.	Wirkungen von Providencia-, Proteus rettgeri- und Proteus morganii-Bakteriozinen auf Stämme der jeweils anderen beiden Arten	50
3.7.1.	Testung von Proteus morganii-Stämmen auf Bakteriozinbildung und -empfindlichkeit ...	50
3.7.2.	Auswahl der Teststämme aus den drei Arten..	51
3.7.3.	Vergleich der Ergebnisse der manuellen und der teilmechanisierten Radialstrichmethode (Multipoint-Inoculator)	52
3.7.4.	Ergebnisse der Kombinationen von Providencia-, Proteus rettgeri- und Proteus morganii- Stämmen	53
4.	DISKUSSION	56
4.1.	Material und Methoden	56
4.2.	Häufigkeit der Bakteriozinbildung bei Providencia und Proteus morganii	58
4.3.	Auffälligkeiten bei der Untersuchung auf Bakteriozinbildung	60
4.4.	Anwendung der Bakteriozinbildung zur Typi- sierung	64
4.5.	Reproduzierbarkeit	67
4.6.	Verwandtschaft von Providencia, Proteus rettgeri und Proteus morganii	68

	Seite:
5. ZUSAMMENFASSUNG	71
6. LITERATURVERZEICHNIS	72
7. LEBENSLAUF	90

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu arbeiten, für die Bereitstellung von Raum, Geräten und Material.

Herrn Prof. Dr. A. Bauernfeind bin ich für die Überlassung des Themas, für die Diskussion der Ergebnisse und Beratung des Fortgangs der Arbeit dankbar.

Frau C. Petermüller, Frau J. Burrows und Frau R. Jungwirth bin ich für geduldige und kundige technische Anleitung zu Dank verpflichtet.

1. EINLEITENDE ÜBERSICHT

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Spektrum der Infektionserreger im Krankenhaus gewandelt. Waren es vor 30-40 Jahren überwiegend grampositive Keime, hat sich dieses Verhältnis zur Seite der gramnegativen verschoben (120). Hieran sind einerseits neu entwickelte invasive diagnostische und therapeutische Techniken wie Intensivüberwachung, Langzeitbeatmung, immunsuppressive und cytostatische Therapie beteiligt, die noch bei schwersten Traumatisierungen und konsumierenden Grunderkrankungen ein Überleben ermöglichen können. "Neben den Pseudomonadaceae sind es ganz überwiegend Enterobakterien der Gattungen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Serratia*, sowie die Genera *Proteus* und *Providencia*, die bei nur geringer bzw. fakultativer Pathogenität für den abwehrschwachen Problempatienten von hoher Virulenz sind" (120). Andererseits aber ist nicht zu übersehen, daß zumindest ein Teil der grampositiven Kokken (hämolyisierende Streptokokken, *Streptococcus pneumoniae*) eine "gleichbleibende und hohe Empfindlichkeit gegen die gängigen Antibiotika aufweisen", viele Enterobakterien dagegen eine hohe primäre und sekundäre Antibiotikaresistenz (120).

Von der Gattung *Providencia* ist bekannt, daß sie durch geringe Ansprüche an den Biotop und durch ihre Resistenz gegen herkömmliche Antibiotika gekennzeichnet ist (97). Die etwas pauschale und im folgenden noch zu präzisierende Aussage, daß *Providencia* "bei Brandwunden in USA heute als häufigster Eitererreger vorkommt", hat bereits Eingang in das "Lehrbuch der Inneren Medizin" von Groß und Schölmerich (74) gefunden. Es erscheint lohnend, sich mit diesem Keim zu befassen. Hierzu seien zunächst die systematische Stellung, klinische Bedeutung und Epidemiologie referiert.

1.1. Systematische Stellung, biochemische Klassifizierung

Die Gattung *Providencia* gehört zu den Enterobacteriaceen. Sie sind gramnegative, nicht sporenbildende Stäbchen, können peritrich begeißelt sein, wachsen aerob oder fakultativ anaerob, bauen Glucose unter Säure-, z.T. auch Gasbildung ab und zeigen eine negative Oxidasereaktion (15).

Den Namen *Providencia*, später *Providencia*, gab 1951 Kauffmann (91) dieser Gattung, die 1943 als "Paracolon 29911" in *Providencia*, Rhode Island, von Stuart et al. (169) beschrieben worden war. Stuart hatte diesem Stamm eine Zwischenstellung zwischen der *Proteus*-Gruppe und den Shigellen eingeräumt. Singer und Bar-Chay (159) schlugen 1954 vor, *Providencia* in die *Proteus*-Gruppe einzubeziehen, weil diese beiden Spezies als einzige Enterobacteriaceen bestimmte Aminosäuren (wie Phenylalanin, Tryptophan) desaminieren konnten. Diese Ansicht wurde 1955 von Shaw und Clarke (158) bekräftigt. Sie stellten außerdem fest, daß der 1921 von Ornstein (123) beschriebene, von Braun und Löwenstein (21) 1923 näher studierte *Bacillus inconstans* die gleichen Eigenschaften besitzt wie Vertreter der *Providencia*-Gruppe. Sie schlugen daher die Bezeichnung *Proteus inconstans* (Ornstein) vor.

Die Einordnung von *Providencia* als *Proteus inconstans* in die *Proteus*-Gruppe war umstritten. Ewing (54) schlug 1958 eine Einteilung in zwei Gattungen, *Proteus* und *Morganella*, vor, 1962 (55) hingegen in *Proteus* und *Providencia*. Er hat letztere Einteilung in seinem Werk "Identification of Enterobacteriaceae" (51) 1972 beibehalten. Hier (S.324) verwehrt er sich ausdrücklich gegen eine Einbeziehung von *Providencia* in die *Proteus*-Gruppe. Demgegenüber schlugen Namioka und Sakazaki (119) 1958 die Einordnung von *Providencia* bei der Gattung *Rettgerella* vor, die zwei Arten, *Rettgerella rettgeri* und *R. providenciae*, umfassen sollte. Rauss (140) 1962 hingegen bevorzugte die Aufteilung in vier Gattungen, *Proteus*, *Morganella*, *Rettgerella*

und Providencia, bis schließlich der "Report" des Intern. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. (143) 1963 alle diese zu einer umfassenden Gattung "Proteus" vereinigte. Diese Einteilung der Gattung Proteus in die Arten mirabilis, vulgaris, morganii, rettgeri und inconstans wurde auch in die 8. Auflage von "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 1974 (15), aufgenommen.

Aufgrund von neueren Untersuchungen über die DNS-Verwandtschaft (22) wurde eine Neueinteilung in drei Gattungen vorgeschlagen: 1. Proteus mit Proteus mirabilis, vulgaris und einer neubeschriebenen Art Proteus myxofaciens (37), 2. Morganella mit Proteus morganii und 3. Providencia mit Providencia alcalifaciens, stuartii und rettgeri. Die American Type Culture Collection hat sich dieser Nomenklatur schon angepaßt (86). Da dieser Vorschlag zur Zeit des Entstehens vorliegender Arbeit noch nicht bekanntgemacht war und auch in neueren deutschen Veröffentlichungen (97) noch nicht geläufig ist, behalte ich die Bezeichnungen von Edwards und Ewing (51) bei.

Allen Proteus- und Providenciabakterien gemeinsam ist neben der schon erwähnten Fähigkeit, aus einigen Aminosäuren die entsprechenden α -Ketosauren zu bilden, eine positive Methylrotreaktion, Wachstum auf cyanidhaltigem Medium, Fehlen der Lactose- bzw. Orthonitrophenyl- β -D-Galactopyranosidspaltung sowie eine negative Voges-Proskauerreaktion (51).

Providenciastämme reagieren darüber hinaus in den gängigen biochemischen Tests üblicherweise folgendermaßen: Indol +, Citrat +, Gelatineverflüssigung -, H_2S -Bildung -, Ornithin -, Lysin -, Arginindecarboxylase - (51). Alle diese Eigenschaften treffen auch für Proteus rettgeri zu. Als Hauptunterschied zwischen diesen beiden Arten wurde lange Zeit die fehlende Harnstoffspaltung von Providencia betrachtet (51) und für die Routinediagnostik empfohlen (28, 50, 180).

Innerhalb der Providenciastämme läßt sich eine weitere Untergliederung in *Providencia alcalifaciens* und *stuartii* (51) bzw. in *Proteus inconstans* A und B (15) vornehmen; und zwar bildet *Proteus inconstans* A (= *Providencia alcalifaciens*) Gas aus Glucose, spaltet Adonitol, nicht aber Inositol, wogegen *Proteus inconstans* B (= *Providencia stuartii*) kein Gas aus Glucose freisetzt, Adonitol nicht, Inositol hingegen wohl spaltet. Weitere Unterschiede sind das Verhalten gegen Trehalose (A: -, B: +) sowie möglicherweise Galaktose (A: -, B: +) (179). Die Harnstoffspaltung als Kriterium zur Differenzierung von *Proteus rettgeri* und *Providencia* steht allerdings schon seit langem in Frage. So beschrieben Singer und Bar-Chay (159) 12 schwach ureasepositive Stämme, deren Verhalten gegenüber einer Reihe von Zuckern und Polyalkoholen sonst dem von *Providencia* entsprach. Auch Shaw und Clarke (158) berichteten über ureasepositive Stämme, die sich in nichts sonst von ureasenegativen typischen *Providencia*-stämmen unterscheiden. Demgegenüber fand Richard (145) urease-negative Stämme, die sich im übrigen wie *Proteus rettgeri* verhielten. Ursing (179) überprüfte zahlreiche biochemische Parameter an *Providencia* und *Proteus rettgeri*-Stämmen. 14 von 108 Stämmen bauten die gleichen Kohlenhydrate ab wie *Providencia stuartii*, waren aber ureasepositiv. Die Unterschiede bezogen sich im einzelnen auf die in Tab.1 angegebenen Stoffe.

Tab.1: Unterschiedliche biochemische Reaktionsmuster von *Proteus rettgeri* und *Providenciastämmen* (nach Ursing (179)).

	<i>Proteus</i> <i>rettgeri</i> (18 Stämme)	Zwischen- gruppe (14 Stämme)	<i>Providencia</i> <i>stuartii</i> (83 Stämme)	<i>Providencia</i> <i>alcalifaciens</i> (8 Stämme)
Trehalose	0	14/14	83/83	0
Erythritol	15/18	0	0	0
Mannit	18/18	0	0	0
Salicin	17/18	0	0	0
Aesculin	18/18	0	0	0

Auf die Rolle von Mannit und Erythritol hatten schon 1958 Namioka und Sakazaki (119) hingewiesen, Richard (145) 1966 auf die Bedeutung von Trehalose, Erythritol, Mannit und Salicin sowie ferner auf Rhamnose (Rettgeri +, Providencia A und B -).

Die exakte Differenzierung von *Proteus rettgeri* und *Providencia stuartii* hat hierbei nicht nur systematisch-bakteriologisches, sondern auch klinisches Interesse. Legt man das unterschiedliche Verhalten gegenüber Harnstoff als Unterscheidungskriterium zugrunde, mußten Washington et al. (182) Stämme aus dem Urin der gleichen Patienten nacheinander als *Proteus rettgeri*, *Providencia stuartii* und wieder als *Proteus rettgeri* klassifizieren; ähnlich erging es 1976 Penner et al. (130). Die Stämme agglutinierten hierbei aber stets das gleiche Antiserum. Farmer III et al. (59) schließlich erhielten *Proteus rettgeri* und *Providencia stuartii* aus einer Blutkultur. Sie konnten beobachten, wie einzelne *Proteus rettgeri*-Stämme ureasepositiv wurden. Sie gehörten alle der Biogruppe 5 entsprechend der Einteilung von Penner et al. (128) an, die sich von *Providencia stuartii* nur in der Urease unterscheidet. Da die Rettgeriurease ein induzierbares Enzym ist (106) und plasmidbedingt sein kann (59) hat Penner (130, 131) gefordert, die Biogruppe 5 von *Proteus rettgeri* in die Gattung *Providencia* einzubeziehen. Hierfür spricht auch, daß alle diese Stämme ein für *Providencia* charakteristisches O-Antigen besitzen (131).

Zur Unterscheidung *Proteus rettgeri*/*Providencia stuartii* - einschließlich *Proteus rettgeri* Biogruppe 5 - eignen sich nach Penner (130) neben dem Trehalosetest auch Adonitol (Rettgeri +, *Providencia stuartii* -) und Arabitol (Rettgeri +, *Providencia* -). Farmer III et al. (59) weisen zusätzlich auf das unterschiedliche Verhalten gegenüber Mannit hin, wenngleich abhängig vom untersuchten Bakterienmaterial unterschiedlich häufig Abweichungen vorkommen. - Rhamnose und Salicin dienen zur Unterscheidung der einzelnen *Proteus rettgeri*-Biogruppen und sind daher weniger für die Artdifferenzierung geeignet.

Obwohl die Möglichkeiten zu einer eingehenden biochemischen Differenzierung von *Providencia* erarbeitet worden waren, beschränkte sich die klinische Routinediagnostik lange Zeit vielfach darauf, diese Keime in den Sammeltopf "coliforme Stäbchen", "*Bact. paracoli*" zu werfen (171), ein Begriff, der wegen seiner Unspezifität nicht mehr verwendet werden sollte (116). Er bezeichnet pauschal laktosenegative und eventuell noch ureasenegative gramnegative Stäbchen (114). Dadurch aber kann die exakte Inzidenz von *Providencia*-infektionen und insbesondere die Häufigkeitsentwicklung nicht hinlänglich bewertet werden (90, 164).

1.2. Klinische Bedeutung und Antibiotikaresistenz

Providencia-stämme können natürlicherweise im Stuhl von Mensch und Tier vorkommen (17, 159, 166), Bhat et al. (17) fanden sie in Indien in 1,3 % der Stühle von Gesunden. Sie sollen im menschlichen Stuhl allerdings nur unter mangelhaften hygienischen Verhältnissen häufig sein, ungewöhnlich dagegen bei hohem hygienischem Standard (147). Außerdem wurde ihr Vorkommen in zerfallendem eiweißhaltigem Material beschrieben (171). Obwohl sie als normaler Bestandteil der menschlichen Darmflora angesehen werden können, wurden sie mehrfach als Erreger von Gastroenteritiden beschrieben (16, 17, 134, 139, 147, 159, 166). In diesen Fällen konnte keiner der üblichen darmpathogenen Keime aus den Stühlen isoliert werden. Der Anteil von *Providencia*-bakterien im Stuhl war bei Erkrankten höher als bei Gesunden und erreichte teilweise 100 % (17). Mögliche Ursachen für die Pathogenität eines sonst saprophytären Keimes könnten eine massive Kontamination, hochempfindliche Personen, eine gestörte Darmflora oder ein besonders virulenter Stamm sein (147). Stenzel (166) fand bei allen erkrankten Kindern den Serotyp O13H30, im Stuhl Gesunder aber stets andere Serotypen. Demgegenüber fanden andere Untersucher (17, 18, 134) bei Erkrankten hauptsächlich den Serotyp O3. Ramadan (139) hat als mögliche Quelle

einer providencia-bedingten schweren Gastroenteritisendemie einen verseuchten Brunnen ausfindig machen können. Soweit die aus Stuhl isolierten Keime beiochemisch weiter differenziert wurden, handelt es sich ganz überwiegend um *Providencia alcalifaciens* (18, 134).

Im klinischen Material der hochzivilisierten Länder dominiert dagegen *Providencia stuartii* (107, 115, 126, 167). Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit Harnwegsinfektionen durch diesen Erreger (23, 49, 118, 154, 165, 167, 168, 171, 185); hierbei scheinen überdurchschnittlich häufig jüngere männliche querschnittsgelähmte Patienten betroffen zu sein (60, 164). Auch im Sputum Pneumoniekranke konnte *Providencia* vereinzelt nachgewiesen werden (40, 93, 94, 164), ferner in Abstrichen infizierter Wunden sowie in Blutkulturen (26, 165, 171), meist im Rahmen einer Septikämie. In den letztgenannten Fällen überlebten die Patienten fast nie (90, 94, 115, 164).

Die Angaben über die Häufigkeit von *Providencia*-Infektionen schwanken. Monto und Rantz (116) 1965 isolierten *Providencia* aus 4 von 91 infizierten Urinen, Straube und Brühl (168) 1967 aus 12 von 813; bei Solberg und Matsen (164) enthielten 1971 etwa 1 % der infizierten Urine *Providencia*. Li und Miller (103) 1970 erhielten bei der Analyse der von einem geriatrischen Krankengut isolierten Keime, die vorwiegend aus Urinen und von Dekubitalgeschwüren stammten, in 276 von 1584 Fällen *Providencia*. Damit stand diese Art nach *Proteus mirabilis* und *Pseudomonas aeruginosa* an 3. Stelle. Keane et al. (93) 1975 berichteten von einem Anwachsen der *Providencia*-Infektionen auf mehr als das Doppelte während 4 Jahren.

Eine bedrohliche Bedeutung scheint die Infektion von Brandwunden durch diesen Keim zu gewinnen (40, 117, 126, 184). Curreri et al. (40) berichten, daß *Providencia* nach *Staphylococcus aureus* als zweithäufigster Keim aus Blutkulturen Verbrannter isoliert wurde und als Todesursache bei diesen Patienten an erster Stelle vor *Pseudomonas aeruginosa* stand. Die Mortalität bei Patienten

mit 30-60 % verbrannter Oberfläche sei gestiegen. Overturf et al. (126) berichten analog, die Kolonisierung von Verbrennungspatienten sei während knapp 1 1/2 Jahren von 10 auf 70 % angestiegen; *Pseudomonas aeruginosa* sei dagegen seltener geworden.

Eine derartige Entwicklung läßt sich durch die ausgeprägte Antibiotikaresistenz von *Providencia* erklären. Nahezu alle Stämme dieser Spezies sind primär tetracyclin- und polymixin- (bzw. colistin-) resistent (83). Während jedoch die Subspezies *alcalifaciens* darüber hinaus gegenüber den gängigen Antibiotika gewöhnlich empfindlich ist (113, 126, 167), zeichnet sich *Providencia stuartii* durch ihre Vielfachresistenz aus. Und gerade diese Subspezies kommt ja im Hospitalbereich ganz überwiegend vor. Hedges (83), der die R-Faktoren von *Providencia* untersuchte, fand hochresistente Stämme gewöhnlich nur unter Hospitalkeimen. Zahlreiche Autoren haben das Resistenzverhalten von *Providencia* untersucht und Resistenzmechanismen analysiert (23, 26, 40, 48, 49, 60, 71, 90, 93, 94, 103, 107, 113, 114, 115, 126, 127, 154, 164, 168, 171, 182, 184, 185). Übereinstimmend fanden sie, daß Sulfonamide, Ampicillin, Cephalosporine, Chloramphenicol und Streptomycin bei in vivo erreichbarer Konzentration so gut wie immer unwirksam waren. Auch gegen das zur Behandlung von Harnwegsinfektionen verwendbare Nitrofurantoin waren *Providenciastämme* fast nie empfindlich. Für Nalidixinsäure findet man unterschiedliche Angaben: Einige Autoren (118, 154, 164) fanden allgemein empfindliche Stämme, andere (171, 185) dagegen überwiegend bzw. durchweg resistente. Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse erhielten verschiedene Autoren bei Carbenicillin.

Die Aminoglykoside Gentamycin und Kanamycin schienen einige Zeit am besten für die Therapie von *Providencia*infektionen geeignet. Fields et al. (60) bezeichneten Kanamycin sogar als Antibiotikum der Wahl, obwohl es unerwünschte Wirkungen haben kann (Ototoxizität, Nephrotoxizität). Mit zunehmendem Gebrauch

dieser Antibiotika entwickelten sich jedoch rasch Resistenzen dagegen. Milstoc und Steinberg (115) beobachteten einen Anstieg der Kanamycinresistenz von 15 auf 45 % während drei Jahren; ähnlich erging es McHale et al. (112), die innerhalb von fünf Jahren einen Anstieg der Kanamycinresistenz von 24 auf 68 % fanden. Keane et al. (93) fanden nach hohem Gentamycinverbrauch nur noch 13 % gentamycinempfindliche Stämme. Auch Whiteley et al. (185) registrierten eine Zunahme gentamycinresistenter Stämme während 18 Monaten. Hamilton-Miller et al. (77) isolierten aus dem Urin eines Patienten zunächst gentamycinempfindliche, später dann gentamycinresistente Providencia. Es war wohl eine resistente Mutante selektiert worden. Die Stämme von Verbrennungspatienten (126, 184) waren fast stets gentamycin- und kanamycinresistent. Tobramycin, das bei *Pseudomonas aeruginosa* oft besser als Gentamycin wirkt, hat bei Providencia keinen solchen Vorteil; keines der beiden Antibiotika war gegenüber den von Duncan und Penner (48) getesteten Isolaten effektiv. Amikacin wirkte auch noch gegen gentamycinresistente Stämme in vitro (47, 144, 148) und in vivo (126). Allerdings fanden schon Wenzel et al. (184) amikacinresistente Providenciastämme bei Verbrannten, die freilich noch carbenicillinempfindlich waren. Overturf et al. (127) berichteten, daß sich unter Amikacintherapie Resistenz gegen dieses Antibiotikum entwickelt hatte. Da diese Stämme bereits kanamycin-, gentamycin-, tobramycin-, sowie carbenicillinresistent waren, muß man sich fragen, welches Antibiotikum hier überhaupt noch anwendbar ist. Man muß wohl dem traurigen Schluß von Naumann (120) folgen: "Handelt es sich um komplett resistente Stämme der Klebsiella-Enterobactergruppe, um Providencia- oder Serratia-Stämme, so verbleibt dem behandelnden Arzt zumeist nur noch die therapeutische Resignation der vorantibiotischen Ära."

Um die Häufigkeit von Providenciainfektionen zu vermindern, bedarf es strikter Asepsis. Eine unsachgemäße Desinfektion könnte aber gerade bei Providencia besonders gefährlich sein: Stickler und Thomas (167) berichteten über Providenciastämme mit einer bis zu 300fach höheren Resistenz gegenüber kationischen Antiseptika -

wie Chlorhexidin - als ein E.coli-Kontrollstamm. Die Anwendung solcher Stoffe in unzureichender Konzentration könnte das Überleben von Providencia im Krankenhaus sogar selektiv begünstigen.

1.3. Übertragungswege und Epidemiologie

Um Providenciainfektionen vorbeugen zu können, sind Kenntnisse ihrer Übertragungswege nötig. Da der Keim natürlicherweise im Stuhl vorkommen kann, wäre eine Verschleppung durch Schmierinfektion denkbar. Mehrere Untersucher überprüften daher den Stuhl erkrankter Patienten auf Providencia (49, 77, 184), z.T. schon bei der Aufnahme Nichtinfizierter (165). In keinem Fall konnte Providencia im Stuhl nachgewiesen werden außer gelegentlich nach Manifestation einer Harnwegsinfektion (165). Es liegt also eine exogene Infektion nahe. Darauf deutet auch hin, daß Providenciainfektionen regelmäßig erst nach längerem Krankenhausaufenthalt auftraten (40, 94), ferner, daß Harnwegsinfekten durch diesen Erreger fast stets Katheterisierungen bzw. andere diagnostische und therapeutische Eingriffe an der Blase vorausgingen (23, 47, 49, 60, 90, 94, 97, 115, 154, 165, 171). Die Suche nach einem Reservoir dieser Keime blieb teilweise ergebnislos (60, 94), andere Untersucher fanden Providencia im Staub und in der Luft (49, 184), wieder andere in Urinbeuteln (182); in einer Verbrennungsabteilung war der Vernebler kontaminiert (117).

Die zunehmende Häufigkeit von Providenciainfektionen, ihre therapeutische Problematik und die Unklarheit über das Keimreservoir lassen eine Typisierung der Isolate unterhalb des Artniveaus für notwendig erscheinen. Das Fehlen einer solchen Typisierungsmethode wurde beklagt (77). Durch sie könnten Infektionsketten erkannt und damit unterbrochen werden, resistentgewordene Mutanten von einer Neuinfektion mit einem anderen Stamm

unterschieden werden. Grundsätzlich bieten sich hierfür an:

- 1.) Biochemische Leistungen (Biotypen)
- 2.) Antibiotogramm (Antibiotypie)
- 3.) Antigencharakter (Serotypie)
- 4.) Phagenempfindlichkeit (Lysotypie)
- 5.) Bakteriozinbildung bzw. -empfindlichkeit (Bakteriozinotypie)

Edwards und Ewing (51) schlagen eine Aufgliederung der Providencia-Stämme in 6 Biotypen anhand der Fermentation von Adonitol, Inositol und der Gasbildung aus Glucose vor (Tab.2).

Tab.2: Die Biotypen von Providencia (nach (51)).

	Biotyp	Gas aus Glucose	Adonitol	Inositol
Providencia alcalifaciens	1	+	+	-
	2	-	+	-
	3	+	-	-
	4	-	-	-
Providencia stuartii	5	-	-	+
	6	-	+	+

Allerdings macht die Biogruppe 1 allein 83,8 % der Alcalifaciens-Stämme aus, die Biogruppe 5 nicht weniger als 96,2 % der Stuartii-Stämme. Damit ist diese Einteilung für epidemiologische Zwecke wenig hilfreich. Gegebenenfalls können Abweichungen im üblichen Verhalten gegenüber Mannit (185), ferner Sucrose, Glucose oder Indol als Marker dienen (164). Insgesamt gesehen aber unterscheidet sich die Mehrzahl der Providenciastämme biochemisch nicht genügend, um daraus eine brauchbare Typisierung zu entwickeln.

Auch das Antibiogramm ist für epidemiologische Zwecke allenfalls äußerst bedingt geeignet. Stämme mit gleichem, charakteristischem Antibiogramm sind zwar wohl als möglicherweise verwandt anzusehen (49, 184), andererseits aber macht die Übertragung von R-Faktoren rasch Änderungen möglich (71, 112). Whiteley et al. (185) fanden bei epidemiologisch verwandten Stämmen gleichen Serotyps verschiedene Antibiogramme.

Die serologische Typisierung von Providenciastämmen wurde zwar von Ewing 1954 (53) erarbeitet, fand jedoch nur sehr begrenzte Anwendung (17, 18, 164, 166). Angesichts des gestiegenen Interesses an diesem Erreger stellten Penner et al. 1976 (129) das O-Antigenschema von Ewing neu auf, wobei sie biochemisch atypische Stämme und solche, die unpassende serologische Reaktionen lieferten, ersetzten. Dieses Schema wurde in der Praxis erfolgreich angewendet (165, 185); Stämme gleicher Herkunft stimmten im O-Serotyp überein. Nach neueren Untersuchungen empfehlen Penner et al. (133, 134) getrennte Schemata für *Providencia stuartii* und *alcalifaciens*, da beide Arten nur selten gemeinsame O-Antigene aufweisen. - Unabhängig von Penner versuchten McHale et al. (112) eine O-Serotypie ihrer Stämme.

Über eine ausschließliche Lysotypie von *Providencia* wurde noch nicht berichtet. - Stickler und Thomas (167) veröffentlichten eine Arbeit über die Typisierung von *Providencia* a) anhand der Empfindlichkeit gegenüber einem Set von Bakteriophagen und Bakteriozinen, b) anhand des Lysis- und Hemmspektrums der von den einzelnen Stämmen gebildeten Phagen bzw. Bakteriozine. Sie verwendeten dazu die Überstände von Flüssigkulturen, ohne zwischen Phagen und Bakteriozinen zu unterscheiden. Es gelang ihnen, 70 von 74 Stämmen in 26 verschiedene Produktions-/Empfindlichkeitsmuster einzuteilen. -

Während der Entstehung der hier vorliegenden Arbeit brachten Al-Jumaili und Fenwick (9) eine Veröffentlichung über "Bakteriozintypisierung von Providenciaisolate" heraus. Ihre Methode basiert auf der Empfindlichkeit der zu untersuchenden Stämme gegenüber 12 Standard-Bakteriozinsynlysaten. Es gelang ihnen, 300 Providenciaisolate 37 Sensitivitätsmustern zuzuordnen. Ein Hinweis auf den Ausschluß von Bakteriophagen fehlt allerdings.

1.4. Was sind Bakteriozine ?

An dieser Stelle sei kurz die Natur der Bakteriozine erläutert. Sie unterscheiden sich von den bekannteren Bakteriophagen dadurch, daß sie die von ihnen befallenen empfindlichen Zellen zwar auch zum Absterben bringen, sich aber nicht in ihnen vermehren können. Die Wirkung eines solchen Agens wurde erstmals 1925 von Gratia (72) an zwei E.coli-Stämmen näher beschrieben. Die Erkenntnis, daß zahlreiche Enterobacteriaceenstämme solche Stoffe bilden können, führte Gratia und Frédéricq 1946 (73) zur allgemeinen Bezeichnung 'Colicin'; die Entdeckung derartiger Antagonismen auch bei anderen Spezies als Enterobacteriaceen veranlaßte Jacob et al. 1953 (88), diese Stoffe als 'Bakteriozine' zu bezeichnen. Er definierte sie als Stoffe von Proteinnatur, deren Produktion für die sie bildende Zelle letal ist, die gegen Stämme der gleichen Art oder nahe verwandter Arten wirken und dabei an spezifische Rezeptoren binden. Der Hauptunterschied zwischen Antibiotika und Bakteriozinen ist also neben der Stoffnatur das sehr enge Spektrum der letzteren (87). - Genetisch wird die Bakteriozinsynthesebildung durch den sog. Col-Faktor determiniert, ein zirkuläres Stück DNA, das natürlicherweise so gut wie immer extrachromosomal vorzuliegen scheint (19, 20). Der Col-Faktor ist somit als Plasmid anzusprechen. Normalerweise wird seine genetische Information nur von einem Bruchteil der Zellen einer Kultur (<1%)

verwirklicht, und zwar während der logarithmischen Wachstumsphase (20). Eine vermehrte Bildung kann durch UV- oder Röntgenstrahlen, Mutagene und Kanzerogene sowie das Antibiotikum Mitomycin C bewirkt werden. Dabei erhöht sich der Anteil der bakteriozinproduzierenden Zellen, nicht die von einer Zelle gebildete Bakteriozinmenge. Die gleichen Agentien sind auch für die Induktion von temperenten Phagen geeignet (20). Stofflich zerfallen die Agentien mit typischer Bakteriozinwirkung (enges Spektrum, keine Vermehrung im Wirt) in zwei sehr verschiedene Gruppen (19).

- 1.) niedermolekulare Substanzen, die gewöhnlich thermostabil und trypsinempfindlich sind, in der Ultrazentrifuge nicht sedimentierbar und elektronenoptisch amorph sind,
- 2.) hochmolekulare Substanzen, die gewöhnlich thermolabil und trypsinresistent, sedimentierbar und im Elektronenmikroskop als phagenähnliche Partikel oder Phagenkomponenten, insbesondere häufig Schwänze, zu erkennen sind.

Typische amorphe Bakteriozine haben Molekulargewichte zwischen 45 000 und 90 000, einzelne aber auch nur um 20 000 (81), ein typisches Phagenschwanzbakteriozin, z.B. von *Serratia marcescens*, erreicht dagegen etwa 2 000 000 (52). Ob man letztere auch als Bakteriozine bezeichnet, ist eine Frage der Definition. Nomura (121) wollte sie lieber als defekte Phagen, also solche, die keinen Zyklus mehr durchlaufen können, bezeichnet haben. Reeves (142) schließt sie in seiner Monographie von der Betrachtung aus, Brandis und Smarda (20) dagegen berücksichtigen sie als "bakteriozinähnliche Substanzen". Eine Unterscheidung zwischen beiden Gruppen ist erst durch eine stoffliche Charakterisierung und elektronenmikroskopische Darstellung möglich.

Die Wirkung der Bakteriozine kann nur bei Bindung an spezifische Rezeptoren erfolgen. Sensible Stämme können diese Rezeptoren durch Mutation verlieren und damit resistent werden. Es kann aber auch die Adsorption an Rezeptoren wirkungslos bleiben; man spricht dann von toleranten Mutanten (81). Da die Zell-

wandfraktion sensibler Zellen in der Lage ist, Bakteriozinmoleküle zu binden, scheinen die Rezeptoren dort lokalisiert zu sein. Hardy (81) vermutet sie hier in der äußeren Membran. Da andererseits Bakteriozine auch auf völlig zellwandfreie stabile L-Formen wirken (160), dürfte die eigentliche Wirkung erst durch Erreichen von Rezeptoren der Cytoplasmamembran erzielt werden. - Bei der Wirkung unterscheidet man ein Stadium I, in dem die Fähigkeit einer mit Bakteriozin versetzten Zelle zur Koloniebildung durch Trypsin wiederhergestellt werden kann. Unter Energieverbrauch erfolgt dann der Übergang ins Stadium II, in dem die Zelle ihre Lebensfähigkeit irreversibel eingebüßt hat (81, 122, 136). Die Auswirkungen der Bakteriozine auf den Stoffwechsel empfindlicher Bakterien sind nicht einheitlich. Die Synthese von Makromolekülen kann gestört, die Membranfunktion beeinträchtigt (61), teilweise auch die DNA degradiert werden (81); ein erheblicher ATP-Abfall wurde auch beobachtet (187). Das Bakteriozinmolekül dringt hierzu zumindest nicht regelmäßig in die Zelle ein, sondern bewirkt von der Oberfläche aus einen biochemischen Störprozeß (20). - Der Producerstamm selbst ist gewöhnlich gegen das von ihm gebildete Bakteriozin immun.

Welche Bedeutung die Bakteriozinbildung in vivo hat, ist umstritten (81). Einerseits lassen die Tatsache, daß sie ohne Induktion meist niedrig ist, sowie die Existenz von Proteasen im Darm ihre Bedeutung fraglich erscheinen. Andererseits konnte gezeigt werden, daß pathogene Enterobakterien oft colicinogen sind, umgekehrt colicinogene Stämme die Ansiedlung pathogener im Darm verhindern könnten (20). - Auch ihre Stellung im Rahmen der Evolution ist spekulativ. Die Bakteriozine mit hohem Molekulargewicht sind wohl von Bakteriophagen herzu-leiten, die von niedrigem Molekulargewicht scheinen. Bestandteile der Bakterienzelle selbst zu sein (19).

1.5. Vorkommen und Verwendung der Bakteriozine

Substanzen von Bakteriozinnatur sind bei einer Vielzahl von Spezies beschrieben worden (20, soweit im folgenden nicht anders angegeben). Um ihre Erforschung bei den Enterobacteriaceen haben sich besonders Frédéricq sowie Hamon und Péron verdient gemacht. Sie beschrieben Bakteriozine bei *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia*, *Erwinia*, *Arizona*, *Enterobacter*, *Aerobacter* und *Citrobacter*. Bis 1965 (141) fehlte bei den Enterobacteriaceen nur noch für *Proteus* und *Providencia* der Bakteriozinnachweis. Craddock-Watson (39) fand dann Bakteriozinbildung bei *Proteus mirabilis* und *vulgaris*, Coetzee (33) bei *Providencia* und *Proteus morganii*. Bei *Proteus rettgeri* konnten dies Craddock und Traub (38) bei 2 von 7 Stämmen zeigen. - Aber auch gramnegative Stäbchen, die nicht zu den Enterobakterien gezählt werden, bilden Bakteriozine: *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Bacterioides* (137); außerdem grampositive Stäbchen - *Listeria monocytogenes* (124) -, grampositive und gramnegative Kokken - Staphylokokken, Streptokokken (98, 99, 100, 152, 153, 188), *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*. Auch bei Sporenbildnern kommen derartige Stoffe vor: *Clostridium septicum* (151), *butyricum* (27) und *perfringens*, *Bacillus cereus* und *megaterium* (46, 87); ferner bei für den Menschen apathogenen Keimen wie *Lactobacillus* (95), *Rhizobium lupini* (69) und *trifolii* (155), bei *Athiorodaceae* (75).

Unabhängig von ihrer möglichen Bedeutung in vivo eignen sich die Bakteriozinbildung bzw. -empfindlichkeit als epidemiologische Marker, da diese Eigenschaften, wenn auch nicht unveränderlich, so doch im allgemeinen genetisch stabil sind. Für eine Reihe epidemiologisch interessanter Stämme sind deshalb Typisierschemata entwickelt worden. Richtunggebend war die Typisierung von *Shigella sonnei* anhand der Bakteriozinbildung durch Abbott und Shannon (1), modifiziert durch Gillies (67). Besonders weite Verbreitung hat die Typisierung

von *Pseudomonas aeruginosa* gefunden (12, 14, 42, 56, 68, 70, 101, 125, 181). Auch bei *Serratia marcescens* wird diese Methode neuerdings angewandt (10, 57; 58, 65, 173). Typisierschemata wurden auch für *E.coli* (104), *Citrobacter* (156) und *Klebsiella* (13, 24) aufgestellt. - Bei *Proteus* hat Cradock-Watson (39) eine Typisierung anhand der Bakteriozinbildung angegeben, Al-Jumaili (5) eine für *Proteus mirabilis* und *vulgaris* anhand der Bakteriozinempfindlichkeit, Senior (157) anhand beider Eigenschaften. Für *Proteus rettgeri* wurde ebenfalls ein Typisierungsverfahren (84) erarbeitet. Über die beiden Versuche, *Providencia*-isolate anhand der Empfindlichkeit gegenüber Bakteriozinen (und Bakteriophagen) zu typisieren (9, 167) vgl. oben !

Die Untersuchung der Bakteriozine ist nicht nur für epidemiologische Zwecke von Nutzen, sie kann darüberhinaus auch Hinweise auf den Verwandtschaftsgrad bakterieller Arten geben. Wie in Jacobs (88) Definition ausgedrückt wird, wirken Bakteriozine gewöhnlich nur auf Stämme der Art, von der sie gebildet werden, oder auf nahe verwandte Arten. Colicine von *E.coli* bzw. Shigellen wirken schon häufiger auf die eigene als auf die andere Spezies (64). Die vorliegende Arbeit untersuchte deshalb die Bakteriozinbildung von *Providencia*-stämmen unter zwei Gesichtspunkten:

- 1.) Feststellung der Häufigkeit der Bakteriozinbildung, um auf dieser Grundlage ggf. eine Typisierung durchführen zu können.
- 2.) Untersuchung der Wirkung von Bakteriozinen der nicht-schwärmenden *Proteus*-spezies (*Proteus rettgeri*, *morganii* und *Providencia*) auf Stämme der jeweils anderen beiden Spezies, um ggf. Aussagen über ihre Verwandtschaft machen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Stämme

Den im folgenden genannten Übersendern von Stämmen sind wir zu großem Dank verpflichtet.

Bei den mit a und b bezeichneten Stämmen handelt es sich um morphologisch unterschiedliche Kolonieformen aus einer Probe.

- Dr. Buckle, Melbourne - Laborbezeichnung Aust(ralien):
Providencia 7, 8, 9, 10
- Dr. Cohen, M. Reese Medical Center, Chicago - Laborbezeichnung Re(ese):
Providencia alcalifaciens; Providencia stuartii T.H. 344,
LR. 409, P.C. 471, R.H. 835, A.S. 1021, C.L. 1132, B.S. 1658,
C.B. 1855
- Dr. Digranes, Bergen - Laborbezeichnung Dig(ranes):
Providencia 18 327/69, 18 558/69, 19 201/69, 392/70, 1540/70,
2925/70, 1622/73
- Dr. Erdman, London (Ursprung: Prof.Dr.C.T.Huang, Hongkong) -
Laborbezeichnung H(ongkong):
Proteus rettgeri H 27b
- Dr. Hedges, London - Laborbezeichnung Hed(ges):
Providencia 125, 132, 143, Aa, Ab, Ca, Cb, Da, Db, E, F, Ha,
Hb, Ja, Jb, STHA, STHBa, STHBb, Bristol 1, Graves 3, 773-68,
46458-72
- Dr. Laforce, Denver (durch Vermittlung von Dr.Jannini und
Prof.Dr.Deinhardt) - Laborbezeichnung D(enver), verwendete
Numerierung jeweils in Klammern:

Proteus rettgeri 657/11-4-74 (D 3), 449/4-20-75 (D 15a), 931/12-4-75 (D 38), 392/3-18-76 (D 40b), 915/9-16-75 (D 43).
Letztgenannter Stamm wurde mit dem api 20E-System als *Providencia stuartii* identifiziert.

- Dr. Linzenmeier, Essen - Laborbezeichnung E(ssen) (bei *Proteus rettgeri*) bzw. Li(nzenmeier) (bei *Providencia*), verwendete Numerierung jeweils in Klammern :
Proteus rettgeri V 22 726/67 (E 7), Bak.588/4.68 (E 12), Bak. 1202/534 (E 17); *Providencia stuartii* B 3071/4.72 (Li 1), B 2920/4.72 (Li 2), B 2830/4.72 (Li 3), B 1369/3.72 (Li 4), B 1561/3.72 (Li 5), B 355/5.72 (Li 6)
- Dr. Lowbury, Birmingham - Laborbezeichnung Low(bury):
Providencia 76/8236, 76/8272, 76/8312, 76/8338, 76/8339, 76/8343, 76/8359, 76/8566, 76/8570, 76/8620a, 76/8620b, 76/8749, 76/8790, 77/4661, 77/4807, 77/4960, 77/5093
- Dr. Misiek, Dr. Price, Bristol - Laborbezeichnung B(ristol), verwendete Numerierung in Klammern:
Bristol Nr. A 21542 (B 7)
- Dr. Namioka, Sapporo - Laborbezeichnung J(apan), verwendete Numerierung jeweils in Klammern:
Proteus rettgeri-Serotypen 7:5 (J 5), 11:16 (J 9), 12:1 (J 10), 15:21 (J 13), 23:1 (J 38), 22:1 (J 87)
- Dr. Potter, Victoria - Laborbezeichnung Pot(ter):
Providencia alcalifaciens 1, 10305; *Providencia stuartii* I, II, III, IV, Vb
- Dr. Rauss, Pécs:
Proteus morganii, in Klammern jeweils der Serotyp: 558 (lab:1), 366(lab:2), 765 (lab:3), C 10 (lab:5), C 120 (lab:7), K 138 (lab:8,18), C 219 (lab:9), 728 (lac:3), 75 (lac:5), 702 (lad:3), 1045 (lad:1), K 186 (lad:2), OKJ 143 (lad:5), C 118 (lad:6),

K 252 (lad:7), C 340 (lad:10,13), 319/1 (2:5), V 265 (2:2),
V 24 (3:6), OKJ 741 (2:6), 278 (4:2), OKJ 274 (4:3), 285 (4:7),
265/a (5:8, 18), 398 (5:10,13), 550 (6:9), C 84 (7:12,13),
Czakó (7:5), 429 (8:1), 449 (10:14), 264 (10:14), 1457 (11:
10,13), 614 (12:11), 547 (13:6), K 197 (14:12), 369 (16:11),
618 (17:8, 18), 658 (19:5), 524 (20:10,13), Pfeiffer (21:15),
OKJ 739 (22:1, OKJ 637 (23:10,13), OKJ 734 (24:16), 274
(25:12,13), 1594 (29:B:19), C 104 (30:20,21), D 34 (31:21, 22),
K 131 (32:23)

- Dr. Rosin, Düsseldorf - Laborbezeichnung Ros(in):

Providencia Va 530/74, Va 606/74, Va 1389/74, Va 1494/74,
Va 345/77, Va 504/77, Va 525/77

- Dr. Sabatelli, Schering Corporation, Bloomfield - Laborbezeichnung Sche(ring):

Providencia stuartii At.0112 707, At. O 204 701 a, At. O
204 701b, At. O 311 701, At. O 811 501a, At. O 811 501b,
At. O 828 507 a, At. O 828 507b, At. O 916 519a, At. O 916
519b, At. 1 011 706, At. 1 011 710

- Dr. Ursing, Malmö - Laborbezeichnung U(rsing), verwendete Numerierung jeweils in Klammern:

Providencia G 5 (U G1), G 26 (U G3), G 36 (U G5), G 45 (U G6),
G 47 (U G7), G 62 (U G8), G 72 (U G9), G 81 (U G10), G 83 (U G11),
G 91 (U G13), G 98 (U G14), G 110 (U G15), G 116 (U G16),
G 123 (U G17), G 133 (U G18), G 134 (U G19), G 135 (U G20),
G 140 (U G21), G 149 (U G22), G 164 (U G23), G 180 (U G24),
G 182 (U G25), G 197 (U G26), G 206 (U G27), G 207 (U G28),
G 210 (U G29), G 214 (U G30), G 232 (U G31), G 262 (U G32),
G 283 (U G33), P 5 (U P34), P 6 (U P35), P 25 (U P36),
P 31 (U P37), P 40 (U P38), P 41 (U P39), P 59 (U P40),
P 65 (U P41), P 76 (U P42), P 83 (U P43), P 101 (U P44),
P 109 (U P45), P 112 (U P46), P 113 (U P47), P 116 (U P48),
P 117 (U P49), P 121 (U P50), P 122 (U P51), P 125 (U P52),
P 126 (U P53), P 131 (U P54), P 133 (U P55), P 134 (U P56),

- P 136 (U P57), P 137 (U P58), P 138 (U P59), P 141 (U P60),
P 143 (U P61), P 147 (U P62), P 148 (U P63), P 151 (U P64),
P 154 (U P65), P 159 (U P66), P 161 (U P67), P 166 (U P68),
P 172 (U P69), P 176 (U P70), P 177 (U P71), P 178 (U P72),
P 183 (U P73), P 184(1) (U P74), P 184(2) (U P75),
P 186 (U P76), P 189 (U P77), P 191 (U P78), P 192 (U P79),
P 193 (U P80), P 195 (U P81)
- Süddeutsche Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft,
Weihenstephan - Laborbezeichnung Weih(enstephan):
Providencia 287
- Sammlungsstämme:
American Type Culture Collection:
Providencia alcalifaciens ATCC 9886, ATCC 12013, ATCC 13 159
Providencia stuartii ATCC 25 825, ATCC 25 826, ATCC 25 827,
ATCC 25 828
- Stämme aus der Abteilung experimentelle medizinische Mikro-
biologie des Max von Pettenkofer-Instituts, München:
Proteus rettgeri (Patientenisolate) M(ünchen) 11, M 103, M 116,
Providencia alcalifaciens (Abwasser der Kläranlage Großlappen)
Abw(asser) 3.2, Abw 3.3, Abw 4.3

2.1.2. Geräte

- Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick
Scientific Company Ltd., zur Inkubation von Flüssigkulturen
unter Schütteln
- Corning Colorimeter 252, zur Messung der optischen Dichte (OD)
von Bakteriensuspensionen bei 600 nm
- Gilford Spectrophotometer 240, zur Messung der Mitomycin C-
Konzentration bei 360 nm
- Denley Multipoint Inoculator, zum Aufbringen der Indikatoren.

2.1.3. Nährmedien, Antibiotika

- Tryptone Soya Broth (Oxoid CM 129) = TSB:
Zusammensetzung (g/l): Pancreatic Digest of Casein 17,0 g,
Papaic Digest of Soybean Meal 3,0 g, Sodium chloride 5,0 g,
Dibasic potassium phosphate 2,5 g, Dextrose 2,5 g;
Konzentration: 30 g/1000 ml aqua dest.
- Mueller-Hinton Agar 1,5 % = MHA:
Mueller Hinton Broth, Difco: Zusammensetzung: Beef Infusion
from 300 g, Casamino acids technical 17,5 g, Bacto-soluble
Starch 1,5 g; Konzentration 21 g/1000 ml aqua dest.;
sowie Difco, Bacto-Agar 15 g/1000 ml aqua dest.
- Difco Tryptic Soy Agar = TSA:
Zusammensetzung: Bacto Tryptone 15 g, Bacto Soytone 5 g,
Sodium Chloride 5 g, Bacto-Agar 15 g;
Konzentration: 40 g/1000 ml aqua dest.
- McConkey-Agar, Oxoid:
Zusammensetzung (g/l): Pepton 20,0 g, Lactose 10,0 g,
Gallensalze 5,0 g, Kochsalz 5,0 g, Neutralrot 0,075 g,
Agar 12,0 g;
Konzentration: 52 g/1000 ml aqua dest.
- Milieu combiné pour la recherche de l'uréase et la
transformation de la L-phénylalanine en acide phenylpyruvique
(180):
Zusammensetzung: Bacto-yeast-extract 1 g, Ammoniumsulfat 2 g,
Na Cl 3 g, K_2HPO_4 1,2 g, KH_2PO_4 0,8 g, dl-b-phenylalanin 2 g,
aqua dest. 997 ml - erhitzen zum Lösen, dann: Harnstoff 5 g,
Phenolrotlösung 3,5 ml (diese zusammengesetzt aus: Phenol-
rot 0,5 g, 1/10 N NaOH 20 ml, aqua dest. 230 ml) - steril-
filtriert mit Minipore-Filter, Porenweite 0,22 μm

- Bunte Reihen: api 20E-Enterobacteriaceae von Api-System SA, Montalieu
- Antibiotika:
 - Mitomycin C - Trockensubstanz, 2 mg, "Kyowa" - importiert von Immuno AG, Wien
 - Polymyxin B - Trockensubstanz, 50 mg, Pfizer GmbH, Karlsruhe

2.2. Methoden

2.2.1. Isolieren und Identifizieren von Providenciastämmen aus Abwasser

Es wurden insgesamt acht Abwasserproben untersucht, drei aus dem Max von Pettenkofer-Institut, München, fünf aus der Münchener Kläranlage Großlappen. Zur Anreicherung wurden zu 240 ml Abwasser 60 ml einer fünffach konzentrierten TSB gegeben, so daß nach Zugabe des Untersuchungsmaterials wieder die übliche Nährstoffkonzentration entstand. Hierzu kamen 300 µl einer Lösung von Polymixin B (Konzentration 2,5 mg/ml), so daß im Ansatz eine Konzentration von 2,5 µg/ml vorlag. - Der Ansatz wurde in einem 1 l Erlenmeyerkolben über Nacht im Schüttler bei 37°C bebrütet. Aus jedem Kolben wurden einige Ösen entnommen und auf MacConkey-Agarplatten ausgestrichen. Lactosenegative Einzelkolonien wurden erneut ausgestrichen, auf Oxidaseaktivität getestet und in einem kombinierten Medium (180; Zusammensetzung s.o.) auf die Fähigkeit zu Harnstoffspaltung und Phenylalanin-desaminierung untersucht.

Hierzu wurde je 1 ml dieses Mediums in einem sterilen Röhrchen mit einigen Kolonien des zu untersuchenden Stammes beimpft und 18-24 hrs bei 37°C bebrütet. Harnstoffspaltung zeigte sich an einer intensiven Hellrotfärbung der Lösung. Nach Zugabe von 1-2 Tropfen einer 10%igen HCl-Lösung (Farbumschlag des Indikators Phenolrot) wurden 2-3 Tropfen einer 10%igen FeCl₃-Lösung zu-

gegeben. Phenylalanin-Desaminaseaktivität zeigte sich an einer Dunkelgrünverfärbung, die im Verlauf weniger Minuten wieder verschwand.

2.2.2. Biochemisches Klassifizieren mit Api 20E

Es wurde entsprechend der Anleitung zu dieser Standardmethode verfahren.

2.2.3. Prüfung auf Bakteriozinsynthese und -sensitivität

2.2.3.1. Die manuelle Radialstrichmethode

Es wurde hierzu die Methode von Bauernfeind (12) angewandt. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 1.) Die Aufbewahrung der Stämme erfolgte auf TSA-Platten im Kühlschrank; sie wurden etwa alle drei Wochen neu ausgestrichen.
- 2.) Vorkultur der potentiellen Bakteriozinproducer-Stämme:
In 4 ml TSB wurden mit einer Öse Keime auf eine optische Dichte (OD) von etwa 0,1 eingimpft. - Bebrütung bei 37°C über Nacht. - Am nächsten Morgen wurden 100 µl dieser Suspension in weitere 4 ml TSB umpipettiert und erneut bei 37°C bis zum Erreichen einer OD von 0,375 bebrütet.
- 3.) Zum Ausstreichen der potentiellen Producer wurde bei allen Providenciastämmen 1,5 %iger Mueller-Hinton Agar (MHA) verwendet. Die Testungen der Providencia-, Proteus rettgeri- und Proteus morganii-Stämme gegeneinander wurde zusätzlich auf TSA ausgeführt. - Jeder zu untersuchende Stamm wurde auf 20 ml MHA bzw. 25 ml TSA in Schalen mit 9 cm Durchmesser ausgestrichen. Die Medien enthielten Mitomycin C in einer Konzentration von 0, 0,05 und/oder 0,1 sowie 0,25 µg/ml. In einigen Fällen waren auch Mitomycin-konzentrationen von 0,01 und 0,15 µg/ml als Ergänzung nötig.

Zur Herstellung dieser Medien wurde Mitomycin C-Trocken-
substanz in Methanol gelöst, die Konzentration mit dem
Gilford-Fotometer anhand der Extinktion bei 360 nm be-
stimmt. Eine Extinktion von 742,0 entsprach hierbei einer
Konzentration von 10 000 µg/ml. Geeignete Volumina dieser
Stammlösung wurden dann zu dem auf etwa 50°C abgekühlten
Agar gegeben. Nach kräftischem Mischen wurden die Nähr-
bodenplatten mit einer 20 ml-Pipette gegossen.

Zum Beimpfen entnahmen wir aus den auf eine OD von 0,375
eingestellten Suspensionen mit einer geeichten Öse 2 x 10 µl
und verteilten sie gleichmäßig im Zentrum der Platte inner-
halb eines vorher markierten zentralen Kreises von 50 mm
Durchmesser. - Die Platten wurden dann 16 Stunden bei 32°C
bebrütet.

- 4.) Entfernen der Producer: Mit einem Objektträger wurde der
Bakterienrasen zu einem Häufchen zusammengeschoben und auf
ein Stück Filterpapier aufgebracht. Danach wurde die Fläche
mit Filterpapier abgetupft. Die so behandelten Platten
wurden 15 min mit Chloroform bedampft: Sie wurden hierzu
umgedreht in eine Glaspetrischale gelegt, die ein mit ca.
1 ml Chloroform vollgesogenes rundes Filterpapierstück
(Schleicher und Schüll Nr. 595, Durchmesser 7 cm) enthielt
(11). Diese Behandlung tötete die noch verbliebenen
mikroskopischen Bakterienreste ab. Die Platten wurden dann
für 30 min geöffnet mit der Agaroberfläche nach unten über
ihre Deckel gelegt, damit alles Chloroform verdunsten
konnte.
- 5.) Vorbereitung und Aufbringen der potentiellen Indikatoren:
Vorkultur entsprechend den Producern. Es wurden lediglich
50 µl davon in 4 ml TSB umpipettiert. Diese wurden dann
bei 37°C so lange bebrütet, bis eine OD von etwa 0,100
erreicht war. Danach wurde diese auf eine OD von 0,030
verdünnt. Auf jede Platte, auf der vorher ein potentieller
Producer gewachsen war, wurden acht Indikatoren nach dem
Schema der Abb. 1 aufgebracht.

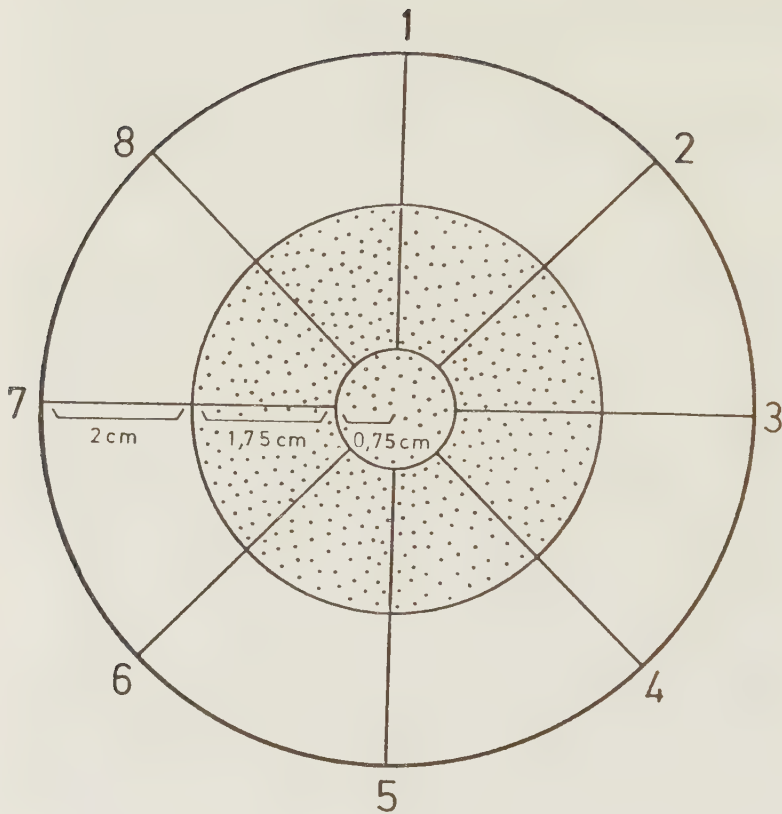


Abb.1:

Anordnung der acht Indikatoren auf den Nährbodenplatten.
Punktiert: Zone vorherigen Producerwachstums.

Zur Erleichterung wurde ein solches Schema unter die jeweils bearbeitete Platte gelegt. Zum Vermeiden von Verwechslungen markierten wir die Stelle des 1. Indikators.

Die Indikatorsuspensionen wurden zum Auftragen in Plastikpetrischalen (Durchmesser 9 cm) gegeben; diese wurden dann leicht schräggestellt. Ein rechtwinklig gebogener Impfdraht mit einer Kantenlänge von 1 cm wurde durch Ausglühen sterilisiert, in die Suspension getaucht und ein Tropfen davon aufgenommen. Dieser Impfdraht wurde im Zentrum der Platte aufgesetzt, auf dem Strich der Schablone zweimal nach außen und wieder zurück und schließlich noch einmal zum Rand geführt. Die Platten wurden dann erneut bebrütet, und zwar 12-16 hrs bei 37°C.

6.) Das Auswerten erfolgte nach folgenden Kriterien:

- + : Im Innenbereich (Zone des Producerwachstums) kein Indikatorwachstum bzw. wenige Einzelkolonien
- +/-: Im Innenbereich zahlreiche Einzelkolonien bzw. schwach konfluierendes Wachstum, aber Hemmung um über 50% im Vergleich zum Randbereich
- /+ : Im Innenbereich noch erkennbare Wachstumsverminderung, jedoch weniger als 50% im Vergleich zum Randbereich.
- : Im Innen- und Außenbereich gleich starkes Indikatorwachstum

Einige Indikatoren wiesen eine Unterbrechung des Wachstums genau am Übergang des vorherigen Producerwachstums in den Randbereich auf. Dies wurde mit "u" vermerkt.

Es wurde auch protokolliert, ob der Indikator auch im Außenbereich im Vergleich zu Platten ohne vorheriges Producerwachstum bzw. nach Wachstum eines anderen Producers reduziert wuchs:

- w : "weg" - kein Wachstum auch im Außenbereich
- f.w: "fast weg": Hemmung überschreitet die Grenze
- s : schwaches konfluierendes Wachstum
- s' : Auflösung des Striches in Einzelkolonien
- iv : "invers": Wachstum im Zentrum, aber nicht im Außenbereich

Die Abb. 2 verdeutlicht diese verschiedenen möglichen Ergebnisse.

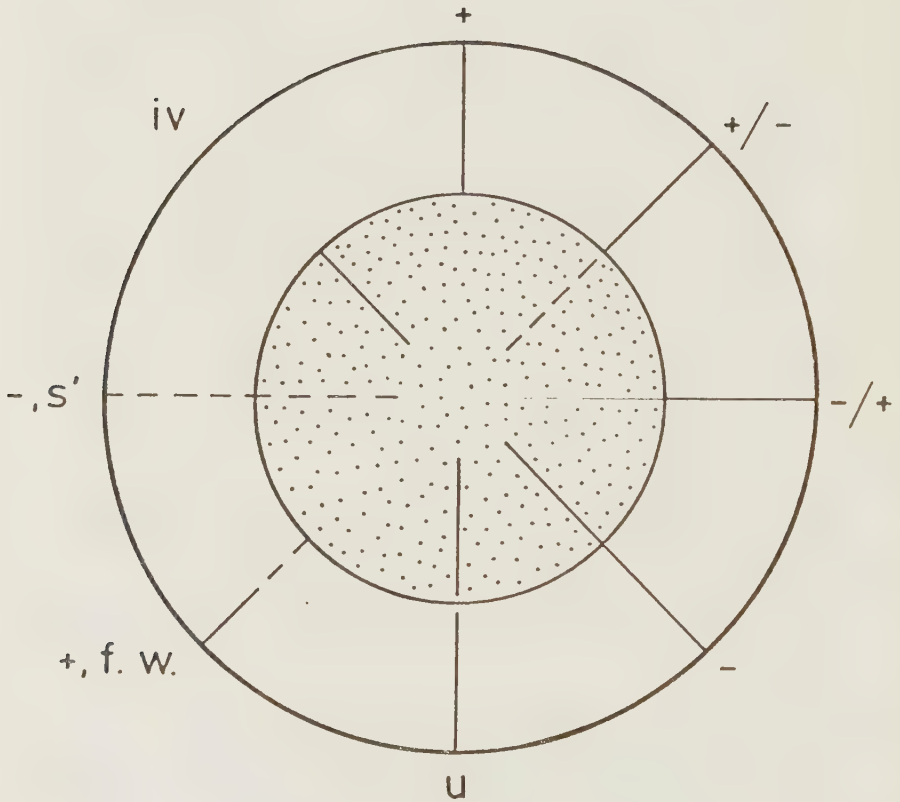


Abb.2: °

Die Ablesung der verschiedenen Arten des Indikatorwachstums. Punktiert: Zone vorherigen Producerwachstums. (Näheres siehe Text)

2.2.3.2. Die teilmechanisierte Radialstrichmethode

Es handelt sich hierbei um eine Methode, die von Bauernfeind et al. (13) zur Bakteriozintypisierung von *Klebsiella pneumoniae* entwickelt wurde. Zu der unter 2.2.3.1. beschriebenen Methode bestehen folgende Unterschiede:

- 1.) Es werden 25 ml TSA als Nährmedium verwendet.
- 2.) Die Maße des Gerätes erfordern, daß der Producerstamm in einem Kreis von 5,5 (statt 5) cm Durchmesser im Zentrum der Platte aufgestrichen wird.
- 3.) Die Indikatoren werden durch Metallstifte auf die Platte aufgebracht. Im einzelnen wird folgendermaßen verfahren:
 - Die Indikatorsuspension wird auf eine OD von 0,065 eingestellt, dann 1:500 verdünnt
 - Volumina von je 1 ml dieser Suspension werden in sterilierte Näpfe pipettiert, pro Stamm in zwei Näpfe.
 - Ein Metallstift taucht in jeden Napf ein und setzt den hängengebliebenen Tropfen auf der Agaroberfläche ab. Von jeder Indikatorsuspension wird ein Tropfen im Bereich vorherigen Producerwachstums abgesetzt, ein zweiter außerhalb davon. Die Verdünnung wurde so gewählt, daß pro Tropfen etwa 200 Koloniebildner enthalten sind. Es wurden acht Indikatoren pro Platte aufgebracht. Anordnung auf der Platte s. Abb.3.
 - Die Auswertung erfolgte in Analogie zu oben durch Vergleich des Wachstums eines Stammes im Innen- und Außenbereich. Es wurden die selben Kriterien und Symbole benutzt.

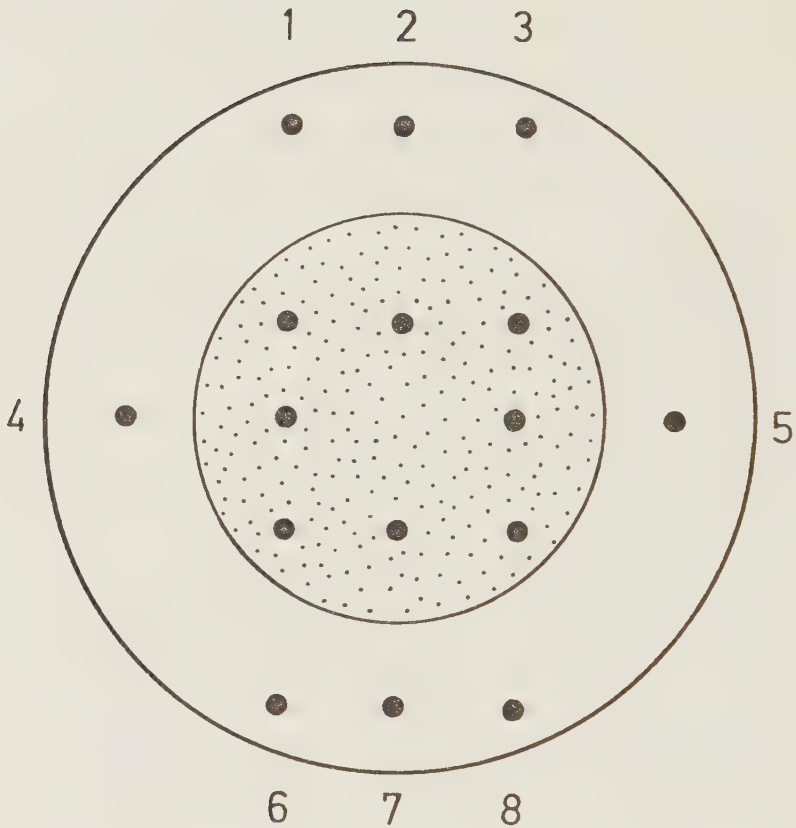


Abb.3:

Anordnung der Indikatoren bei der teilmechanisierten Kreuzstrichmethode. Punktiert: Zone vorherigen Producerwachstums.

2.2.4. Ausschluß von Bakteriophagen

Die Producer wurden in der gleichen Weise wie oben beschrieben auf Platten verschiedener Mitomycinkonzentration ausgestrichen, bebrütet, entfernt, und die Platte chloroformiert. Die Indikator-suspensionen wurden auf eine OD von 0,030 (anfänglich zusätzlich 0,100 und 0,300) eingestellt. Sodann wurden 100 µl einer Suspension auf eine Platte pipettiert und über die ganze Fläche ausgespatelt. Jeder Indikator wurde auch auf frischen Platten verschiedener Mitomycinkonzentration ausgespatelt. Nach Bebrütung bei 37°C über 12-16 hrs wurden die Platten nach folgenden Gesichtspunkten beurteilt:

- scharfe Begrenzung des Indikatorrasens am Übergang von der zentralen Zone vorherigen Producerwachstums zum Außenbereich
- Bewuchs des Zentrums
- Phagenlöcher, sog. Plaques, im Innenbereich (falls dort noch konfluierendes Wachstum) und insbesondere im Außenbereich.

Dieser Punkt wurde auch auf den Platten ohne vorheriges Producerwachstum überprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung von Providenciastämmen aus Abwasser

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode gelang es, aus zwei Großlappener Abwasserproben jeweils zwei Stämme zu gewinnen, die auf MacConkey-Agar laktosenegativ, ferner oxidasenegativ, ureasenegativ und phenylalanindeaminasepositiv waren. Diese Stämme erwiesen sich bei Testung mit api 20E als *Providencia alcalifaciens*. - Anfänglich war auf eine Testung der Oxidase verzichtet worden und die Phenylalanindeaminase mit einem phenylalaninhaltigen Agar untersucht worden. Dabei ergaben sich aber Stämme, die mit der Bunten Reihe als *Aeromonas hydrophila* identifiziert wurden. In der Tat zeigen 25 % dieser Spezies schwach positive Phenylalanindeaminasereaktionen (102, S.232).

Bei zwei aus einer Abwasserprobe isolierten Stämmen (Abw 4.3 und 4.7) zeigte es sich in der Folge, daß sie genau die gleichen Stämme im Wachstum hemmten und auch stets gemeinsam von den gleichen Producerstämmen gehemmt wurden. Es wurde daher angenommen, daß der selbe Stamm doppelt isoliert worden war. Die beiden anderen aus einer Probe isolierten Stämme (Abw 3.2 und 3.3) unterschieden sich dagegen deutlich in ihrer Bakteriozinsensibilität.

3.2. Biochemische Charakterisierung der Stämme

Sämtliche für die Untersuchung vorgesehenen Stämme wurden mit api 20E untersucht. 181 Stämme konnten als *Providencia* identifiziert werden. Nur diese wurden dann auch in die Untersuchung einbezogen. Bei 162 von ihnen ergab das api-Coder-System *Providencia stuartii* und bei 19 *Providencia alcalifaciens* als wahrscheinlichste Zugehörigkeit. Tab.3 gibt die Häufigkeit an, mit der diese 181 Stämme die einzelnen Reaktionen erbrachten. Sie vergleicht außerdem die Ergebnisse mit den Durchschnittsergebnissen, die

das api 20E-System für *Providencia alcalifaciens* bzw. *Providencia stuartii* liefert. Die eigenen Ergebnisse kommen diesen Prozentzahlen meist sehr nahe. Die etwas zu geringe Zahl citratpositiver Stämme dürfte auf das nach unseren Erfahrungen nicht allzu seltene Auftreten von falschnegativen Ergebnissen zurückzuführen sein. In der Tat wurde in einigen Fällen ein zunächst negatives Resultat bei der Wiederholung positiv.

Tab.3: Biochemische Reaktionen der verwendeten 181 Stämme

	positiv	in %	api-Durchschnittsergebnis (in %) für <i>Providencia stuartii</i> <i>alcalifaciens</i>	
Orthonitrophenol-glucosespaltung	0	0	0	0
Arginindihydrolase	0	0	0	0
Lysindecaboxylase	1	0,5	1	0
Ornithindecaboxylase	0	0	0	0
Citratspaltung	158	87,2	91	98
H ₂ S-Bildung	0	0	0	0
Urease	0	0	0	0
Tryptophandeaminase	179	98,9	92	99
Indolbildung	170	93,9	92	99
Voges-Proskauer-Reaktion	0	0	0	0
Gelatineverflüssigung	0	0	0	0
Glucoseabbau	180	99,4	99	99
Mannitabbau	2	1,1	1	3
Inositolabbau	162	89,5	99	3
Sorbitolabbau	1	0,5	0	0
Rhamnoseabbau	0	0	0	0
Sucroseabbau	6	3,3	4	3
Melibioseabbau	0	0	0	0
Amygdalinabbau	0	0	1	0
Arabinoseabbau	0	0	3	3

Von den drei für die Differenzierung von Providenciastämmen in *alcalifaciens* und *stuartii* üblicherweise verwendeten Reaktionen, der Gasbildung aus Glucose, der Adonitol- und Inositolspaltung (51) prüft das api 20E-System nur die Inositolspaltung. Eine Einteilung in die vorgeschlagenen 5 Biogruppen ist daher nicht möglich. Stämme, die Glucose unter Gasbildung vergären, Adonitol und auch Inositol abbauen - Edwards und Ewing (51) fanden vier davon unter 633 Stämmen von *Providencia alcalifaciens* - würden fälschlicherweise zu *Providencia stuartii* gerechnet werden.

3.3. Mitomycinresistenz der Stämme und Wahl der Mitomycin-konzentration

Hellinger (84) hatte zur Induktion der Bakteriozinsynthese bei *Proteus rettgeri* Konzentrationen an Mitomycin im Agar von 0,01, 0,1 und 0,25 µg/ml verwendet.

Da die Mitomycinresistenz der Providenciastämme nicht bekannt war, wurde jeder Stamm, der auf Bakteriozinbildung untersucht werden sollte, zunächst auf insgesamt 4 Platten ausgestrichen, die 0, 0,05, 0,1, 0,25 µg/ml an Mitomycin enthielten. Später wurde dann die Konzentration von 0,1 µg/ml weggelassen. Der Grund, die Konzentration von 0,05 µg/ml derjenigen von 0,1 µg/ml vorzuziehen, lag darin, daß

- 1.) eine Anzahl von Stämmen nur bei 0 bzw. 0,05 µg/ml nachweisbar Bakteriozin bildeten, bei höheren Konzentrationen aber trotz allenfalls geringfügig reduzierten Wachstums nicht mehr (z.B. Bristol F, Hed 125, Hed 132),
- 2.) einige bakteriozinempfindliche Stämme zugleich so mitomycinempfindlich waren, daß ihre Hemmung durch Bakteriozin bei 0,05 µg/ml noch nachweisbar war, bei 0,1 µg/ml der Stamm bereits nicht mehr anwuchs (z.B. Hed STHBa und b, ATCC 12013). Diese Indikatorstämme wuchsen allerdings in der Regel auf Platten mit 0,1 µg MC/ml an, wenn diese vorher unbewachsen

oder mit einem Stamm bewachsen gewesen waren, der kein Bakteriozin gegen sie produzierte. Im letzteren Fall wuchsen sie bevorzugt oder ausschließlich im Bereich vorhergehenden Bakterienwachstums an (iv), möglicherweise weil ein Teil des Mitomycins im Agar durch seine Wirkung auf die potentiellen Producer verbraucht worden war.

In einigen Fällen waren allerdings später noch Wiederholungen in anderen Konzentrationen nötig:

1. Wo bei 0,05 µg/ml noch keine ausreichende Bakteriozinproduktion erfolgte, um den Indikator zu hemmen, dieser jedoch bei 0,25 µg/ml bereits nicht mehr anwuchs, war eine zusätzliche Ausführung bei 0,1 µg/ml bzw. 0,15 µg/ml erforderlich. Tritt ein solches Verhalten bei einem Indikator auf, der 0,25 µg/ml in anderen Fällen durchaus noch erträgt, kann dieses Verhalten auf einen Synergismus zwischen Bakteriozin und Mitomycinwirkung oder aber auf der Diffusion des Bakteriozins über die ganze Platte beruhen.
2. Potentielle Producerstämme, die so mitomycinempfindlich waren, daß sie bei 0,05 µg/ml bereits deutlich reduziert wuchsen (ATCC 12013, ATCC 13159) wurden in den Stufen 0, 0,01, 0,05 µg/ml getestet; Producerstämme, die bei 0,25 µg/ml deutlich reduziert wuchsen (Li 2, Dig 392/70) wurden bei 0, 0,05, 0,1 µg/ml untersucht.

Tabelle 4 gibt Auskunft über die Häufigkeit verschiedener Grade von Mitomycinempfindlichkeit bei den einzelnen Konzentrationen nach makroskopischer Beurteilung des Bewuchses. Die unter 3.7. besprochenen Morganiistämme sind mit aufgeführt. Es fällt auf, daß nur 7 von 181 Providenciastämmen (3,8 %) bei 0,25 µg/ml um die Hälfte oder mehr im Wachstum gehemmt werden, hingegen 8 von 32 der Stämme von *Proteus morganii* (= 25 %).

Tab.4: Mitomycinempfindlichkeit der verwendeten Stämme von *Providencia* und *Proteus morganii*.

181 Stämme der Gattung *Providencia*

	bei 0,25 µg/ml	bei 0,05 µg/ml
nicht erkennbar gehemmt	148	177
weniger als 1/4 gehemmt	10	1
etwa 1/4 gehemmt	16	1
etwa 1/2 gehemmt	3	1
etwa 3/4 gehemmt	2	1
fast vollständig gehemmt	2	1

32 Stämme von *Proteus morganii*

	bei 0,25 µg/ml	bei 0,1 µg/ml
nicht erkennbar gehemmt	19	27
weniger als 1/4 gehemmt	3	
etwa 1/4 gehemmt	2	4
etwa 1/2 gehemmt	6	
etwa 3/4 gehemmt	1	1
fast vollständig gehemmt	1	

3.4. Testung der Providenciastämme auf Bakteriozinbildung und
-empfindlichkeit

3.4.1. Testung von 73 Stämmen gegeneinander als Producer und
Indikator

Da zu Beginn keine als Bakteriozinproducer bzw. -indikatoren bekannten Stämme zur Verfügung standen, wurde zunächst jeder Stamm gegen jeden als potentieller Producer bzw. Indikator getestet, und zwar als erste Bristol 7, Denver 43, Weihenstephan 287, die aus Abwasser isolierten Stämme, die 22 Stämme

von Dr. Hedges, 7 Stämme der American Type Culture Collection, die 6 Stämme aus Essen sowie 32 Stämme von Dr. Ursing, wobei aus den mit G und P bezeichneten Stammgruppen je 16 Stämme ausgewählt wurden.

Die mit diesen 73 Stämmen insgesamt möglichen 5329 Kombinationen wurden zu rund 88 % geprüft. Bei der Testung der 32 Ursingstämme als Bakteriozinbildner gegen die gleichen 32 als potentielle Indikatoren sowie gegen weitere 20 Stämme, die sich schon als Indikatoren erwiesen hatten, stellten sich nur zwei Producer heraus. Ich verzichtete daher auf eine Überprüfung der verbliebenen 21 der 73 Stämme als potentielle Indikatoren gegenüber diesen Stämmen.

3.4.2. Testung der übrigen Providenciastämme gegen die gefundenen Indikatoren

Mit Hilfe der oben gewonnenen 33 Indikatoren wurden alle 108 verbliebenen Stämme auf Produktion von Bakteriozinen gegen diese Indikatoren getestet. Außerdem testete ich jede Stammgruppe (Lowbury, Potter, Cohen (Reese), Sabatelli (Schering), Digranes, Buckle (Australien)) als potentielle Producer und Indikatoren gegeneinander in der Hoffnung, Stämme aus einem begrenzten geographischen Raum könnten eher durch Produktion aufeinander wirksamer Bakteriozine in Wechselwirkung stehen als Stämme unterschiedlicher geographischer Herkunft.

Nachdem ausgeschlossen war, daß die beobachteten Hemmwirkungen nur durch Phagen hervorgerufen worden waren (s.u.3.6.) verblieben 82 der 181 Stämme (45,3 %) bei denen Bakteriozinbildung gezeigt werden konnte. Hierbei wurden alle Fälle, die ein + bzw. +/- erbracht hatten als positiv, also bakteriozinbildend, gewertet, ein -, -/+ oder u dagegen als negativ. - Eine Aufgliederung der Producer in die Gruppen verschiedener Herkunft zeigt Tab.5. 21 der 82 Producer bildeten ein Bakteriozin spontan, d.h. ohne Induktion. Dies sind 11,6 % aller Stämme bzw. 25,6 % der Producer.

Die spontane Hemmwirkung erstreckt sich hierbei zumeist nur auf einen Teil der Indikatoren; eine Ausnahme bildet U P79 insofern, als hier nur ein Indikator gefunden wurde.

Tab.5: Aufgliederung der Bakteriozinproducer (nach Phagenausschluß)

Gruppe	Zahl der Stämme	Zahl der Producer	Zahl der ge- prüften In- dikatoren	Zahl der Spon- tanproducer	Stammbezeichnung der Spontanproducer
Bristol 7 Denver 43 Weihenstephan 287 Abwasser	6	4	73	2	B7, D43
Hedges	22	14	73	4	125,132,Bristol 1, Graves 3
ATCC	7	3	73	-	-
Linzenmeier	6	5	73	-	-
Ursing	78	11	32 Stämme gegen 52 Indikat., 46 Stämme gegen 36 Indikat.	2	P40, P79
Lowbury	17	17	49	4	77/4661, 77/4807, 77/4960, 77/5093
Potter	6	4	40	-	-
Cohen (Reese)	9	6	43	4	344, 1132, 1658, 1855
Sabatelli (Schering)	12	10	44	4	0828507a, 0828507b, 0916519b, 1011706,
Digranes	7	6	43	-	-
Rosin	7	2	42	1	Va 1389/74
Buckle (Australien)	4	-	40	-	-
Gesamt	181	82		21	

Es darf allerdings nicht übersehen werden, daß 78 der 181 Stämme (43 %) von einem Sender (Dr. Ursing, Malmö) stammen. Gerade bei diesem Material konnte aber nur bei 14 % (11 von 78 Stämmen) Bakteriozinbildung nachgewiesen werden. - Betrachtet man nur die übrigen 103 Stämme, so sieht man, daß nicht weniger als 69 % (71) von ihnen ein Bakteriozin produzieren; der Anteil der Spontanproducer an der Gesamtzahl der Stämme erhöht sich auf 18,4 %. Lediglich der Anteil der Spontanproducer an den Producern liegt mit 18,2 % (2 von 11) bei den Ursingstämmen wenigstens in der selben Größenordnung wie die 26,8 % (19 von 71) bei den übrigen.

Da sämtliche Stämme als potentielle Producer mindestens gegen die gleichen 33 Indikatoren getestet wurden, lassen sich ihre Hemmspektren diesen gegenüber vergleichen. Producer mit gleichem Spektrum können zusammengefaßt werden, solange sie sich nicht gegenüber einem neuen Indikator uneinheitlich verhalten. Die 82 Producer ließen sich so in 54 Producertypen mit unterschiedlichem Spektrum einteilen. Tab.6 gibt an, welche Producer sich zusammenfassen lassen und welches Indikatorspektrum sie hemmen.

Tab.6: Gemeinsames Spektrum mehrerer Producer

Zusammenfaßbare Producer	von ihnen gehemmte Indikatoren
Hed Aa Hed Ja	U G1
Hed Db Sche 0916519	Li 2
Hed Jb Li 1	Li 2, U P44
Li 4 Li 5 Sche 0204 701 a	Hed Hb, Li 2

Fortsetzung Tabelle 6

Zusammenfaßbare Producer	von ihnen gehemmte Indikatoren
Dig 19201/69 Dig 392/70 Dig 2925/70	U P38, U P44, U P47
Hed STHBa Hed STHBb Sche 0916519b U G29	Hed Ab, Hed Db, Hed Hb, Hed Jb, Li 2, U P47
Pot Prov.stuartii I Pot Prov.stuartii III Pot Prov.stuartii IV	Hed Ab, Hed Db, Hed Hb, Hed Jb, Hed T 3.68, Li 2, U P47
Hed 125 Hed 132	Abw 3.3, Hed 143, Hed STHBa, Hed STHBb, Hed T 3.68, U G7, U P34, U P38, U P39, U P41, U P44, U P45, U P47, U P49
Low 77/4661 Low 77/4807 Low 77/4960	Hed Db, Hed Hb, Hed Jb, Hed STHBb, Hed 46458-72, ATCC 9886, ATCC 12013, Li 2, U G1, U G7, U P38, U P41, U P44, U P47, U P49
Low 77/5093	im Vergleich zu obigen als einziger Unterschied bei U P38 -/+ statt +/-
ATCC 25825 Dig 18558/69	Abw 3.2, Abw 3.3, Abw 4.3, Hed 143, Hed Ab, Hed Db, Hed Hb, Hed Jb, Hed STHBb, Hed 46458-72, ATCC 9886, ATCC 12013, ATCC 25828, Li 2, U G7, U G15, U P38, U P44, U P45, U P47
Low 76/8236 Low 76/8272 Low 76/8316 Low 76/8338 Low 76/8339 Low 76/8343 Low 76/8359 Low 76/8566 Low 76/8570 Low 76/8620b Low 76/8749 Low 76/8790	Abw 3.2, Abw 4.3, Hed 143, Hed Ab, Hed Db, Hed Hb, Hed Jb, Hed STHBa, Hed STHBb, Hed 46458-72, ATCC 9886, ATCC 12013, Li 2, U G8, U G18, U P34, U P38, U P39, U P44, U P45, U P47

Besonders fällt auf, daß mehrere Stämme gleicher Herkunft anscheinend vom gleichen Bakteriozintyp sind (Potter-Providencia stuartii I, III, IV, Digranes 19201/69, 392/70, 2925/70, 11 Low-Stämme aus dem Jahr 1976 und drei Low-Stämme aus dem Jahr 1977). Da diese Stämme wohl aus den laufenden Einsendungen an ein klinisch-bakteriologisches Routine-laboratorium stammen, scheint sich eine epidemiologische Anwendbarkeit der Bakteriozintypie bei Providencia durchaus abzuzeichnen.

Einige Stämme, die Bakteriozine produzierten, hemmten keinen der genannten 33 Indikatoren, dafür aber einen oder mehr zusätzlich getestete. So hemmte Sche O 112 707 lediglich die Stämme Sche O 916 519a, Sche O 916 519b, Sche 1 O11 710; der Stamm Sche 1 O11 710 hemmte Sche O 204 701a, Sche O 204 701b und der Stamm U P79 hemmte Sche O 204 701a. Bei Testung weiterer Stämme als Indikatoren wäre also zu erwarten, daß noch mehr Bakteriozinproducer entdeckt werden könnten, sowie, daß Stämme mit bisher gleichem Spektrum differenziert werden könnten. Letzteres erscheint besonders bei Bakteriozinen mit sehr engem Hemmspektrum wahrscheinlich.

Andererseits muß angemerkt werden, daß bei der Bewertung einer Hemmwirkung als +/- oder -/+, die dann endgültig im 1. Fall als positiv, im 2. Fall als negativ gewertet wird, tatsächlich oft relativ feine Unterschiede vorliegen. So stimmen die Producer Re 344 und Re 1855 in 4 Indikatoren überein (Weih 287, Abw 3.3, Hed T 3.68, Li 2), sie unterscheiden sich lediglich darin, daß auch im Wiederholungsfall Re 344 gegenüber Hed 143 mit -/+, Re 1855 dagegen mit +/- reagierte. Noch ausgeprägter ist die Ähnlichkeit zwischen Low 77/4661, Low 77/4807, Low 77/4960 einerseits und Low 77/5093 andererseits, die übereinstimmend 14 Indikatoren hemmten, sich gegenüber U P38 jedoch durch ein +/- bzw. -/+ unterschieden. Auch hieran konnte durch eine Wiederholung nichts korrigiert werden. Es liegt aber nahe, daß sie das gleiche Bakteriozin bilden, auch wenn sie den Kriterien

zufolge als Stämme mit verschiedenem Spektrum aufgeführt werden mußten.

In Analogie zu den Producern wurden die Indikatoren nach Übereinstimmung im Hemmspektrum analysiert. Unter den 33 Indikatoren waren allerdings nur zwei mit gleichem Spektrum, nämlich Hed STHBa und U P39. Wir können also 32 verschiedene Indikatortypen unterscheiden. - Allerdings findet sich auch bei den Indikatoren ein Stammpaar (Hed 46458-72 und ATCC 9886), das sich nur im Verhalten gegenüber einem Producer (Sche 0828507a) durch ein '+' bzw. 'u' unterscheidet, in 21 weiteren Fällen aber übereinstimmt. Betrachtet man, von wieviel verschiedenen Producern die einzelnen Indikatoren gehemmt werden, so schwankt diese Zahl zwischen minimal zwei Producern (Li 1) und maximal 34 (Li 2). Die Mehrzahl der Indikatoren liegt dabei in der niedrigeren Hälfte, wie Tab. 7 zeigt.

Tab.7: Spektrenbreite der Indikatoren und deren Häufigkeit

Anzahl der hemmenden Producer	Anzahl der gehemmten Indikator- stämme
1 - 8	11
9 - 17	8
18 - 25	7
26 - 34	6
	Summe : 32

Umgekehrt kann man betrachten, wie die Anzahl der von einem Producertyp gehemmten Indikatortypen verteilt ist. Sie reicht von 1 bis 22 der 32 Indikatortypen. Dabei scheinen sowohl engere als auch breitere Spektren bevorzugt vor mittleren vorzukommen (s.Tab.8).

Tab.8: Spektrenbreite der Producertypen und deren Häufigkeit

Anzahl der gehemmten Indikatoren	Anzahl der hemmenden Producertypen
1 - 7	30
8 - 14	8
15 - 22	<u>16</u>
	Summe : 54

Eine Reihe von Indikatoren erwies sich zugleich als Bakteriozinbildner: Weih 287, Abw 4.3, Hed 143, Hed Db, Hed Jb, Hed STHA, Hed STHBa, Hed STHBb, Li 1; ferner Sche O 112 707, Sche O 204 701a, Sche O 204 701b, Sche O 916 519b, Sche 1 011 710, Ros Va 1389/74.

Eine Besonderheit zeigte sich bei dem Stamm Abw 4.3. Das von ihm nach Induktion gebildete Bakteriozin war auch bei mehrmaliger Wiederholung in der Lage, den Producerstamm selbst um mehr als 50 % im Wachstum zu hemmen. Dieser Stamm ist demnach gegenüber seinem eigenen Bakteriozin empfindlich.

Es wäre von Interesse, die mit a und b bezeichneten kulturmorphologisch verschiedenen Stämme eines Isolates bezüglich ihrer Bakteriozinproduktion bzw. -empfindlichkeit zu untersuchen. Von den 11 derartigen Fällen unterschieden sich 9 schon durch das Hemmuster der von ihnen gebildeten Bakteriozine (Hed Aa/b, Hed Ca/b, Hed Da/b, Hed Ha/b, Hed Ja/b, Low 76/8620a/b, Sche O 204 701a/b, Sche O 828 507a/b, Sche O 916 519a/b,), d.h. entweder produzierte nur die a- oder b-Form oder das Spektrum der beiden war verschieden. - Während Hed STHBa und b die gleichen Indikatoren im Wachstum hemmten, unterschieden sie sich als Indikatoren erheblich. - Bei den Stämmen Sche O 811 501a/b erwies sich nur die b-Form als Indikator, so daß in allen obigen Fällen Unterschiede in

der Bakteriozinproduktion bzw. -empfindlichkeit erkennbar sind.

Wirkung der Bakteriozine von *Providencia alcalifaciens* und *stuartii* auf die jeweils andere Spezies: Im Untersuchungsmaterial standen 162 *Providencia stuartii*-Stämmen nur 19 *alcalifaciens*-Stämme gegenüber. Von letzteren zeigten sich 4 als Producer. Ihre Bakteriozine wirkten auch gegen *Providencia stuartii*-Stämme. 8 *Alcalifaciens*-Stämme reagierten als Indikatoren. Sie wurden in vielen Fällen auch von *Stuartii*-Bakteriozinen gehemmt. Eine Beschränkung der Bakteriozinwirksamkeit einer Spezies jeweils nur auf Stämme der eigenen Art scheint sich also nicht abzuzeichnen.

3.5. Reproduzierbarkeit

Es wurden bei den einzelnen Versuchsserien regelmäßig bereits bekannte Kombinationen zur Kontrolle wiederholt, ferner wurden zweifelhafte Fälle, solche, bei denen das Ergebnis unklar war, sowie zahlreiche Fälle mit einem +- oder -+-Ergebnis nochmals ausgeführt. Das Ergebnis von 656 wiederholten Kombinationen zeigt Tab.9.

Tab.9: Übereinstimmung bzw. Abweichung bei wiederholter Testung

Ergebnis der Wiederholung	Zahl der wiederholten Kombinationen
+ bzw. +/- geblieben	134, dabei 106 Kombinationen 2fach, 24 Kombinationen 3fach, 4 Kombinationen 4fach getestet
- bzw. -/+ geblieben	434, dabei 385 Kombinationen 2fach, 48 Kombinationen 3fach, 1 Kombination 4fach getestet
Abweichungen: von + nach -	35
von +/- nach -	30
von +/- nach -/+	16
von + nach -/+	5
von + nach u	2

Von allen Wiederholungen ergaben also 88 - entsprechend 13,3 % - ein abweichendes Ergebnis. In diesen Fällen wurde das durch eine (oder mehr) weitere Wiederholung(en) erzielte Ergebnis als für die Bewertung ausschlaggebend angesehen.

Es muß allerdings angemerkt werden, daß es sich um keinen systematischen Ansatz zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit handelt. Vielmehr sind überdurchschnittlich viele Problemfälle inbegriffen. - Nicht weniger als 33 der abweichenden Fälle gehen darauf zurück, daß die Hemmwirkung der 13 Stämme Low 76/8236 bis 76/8790, die ein weitgehend identisches Hemmspektrum aufwiesen, gegenüber den Indikatoren Abw 3.3, ATCC 25828 und U G7 während des Versuches wechselte. So ergab beispielsweise die Testung von Low 76/8338 als Producer gegen ATCC 25828 nacheinander die Resultate +, -, +, -, oder Low 76/8336 gegenüber dem gleichen Indikator +, u, +, -. Dagegen blieb die Hemmwirkung gegenüber anderen getesteten Stämmen (Hed Ab, Hed Db, Hed Hb, Hed Jb, U P47) bei Wiederholungen stabil.

Die von einem Producer gebildete Bakteriozinmenge schien sich während der Weiterkultivierung des Stammes auf Platten, die im Kühlschrank aufbewahrt wurden, verringern zu können, desgleichen vielleicht auch die Indikatorempfindlichkeit. Diese Vermutung ergibt sich aus folgendem Befund: Wird von den 4°C in der Sammlung aufbewahrten Proben der als Producer bzw. Indikator verwendeten Stämme Material abgenommen, ausgestrichen und zur Testung verwendet, kann man folgendes Ergebnis erhalten:

Indikator	ATCC 25828 weiterkultiviert auf Platten	ATCC 25828 aus der Sammlung
Producer		
ATCC 25827 weiterkultiviert auf Platten	-/+	+/-
ATCC 25827 aus der Sammlung	+	+

Bestimmte Indikatoren sowie bestimmte Producer scheinen besonders häufig variable Ergebnisse zu liefern. So reagierte der Indikator Abw 3.3 in 13, der Indikator ATCC 25828 in 16 und der Indikator U G7 in 19 Fällen bei Wiederholungen unterschiedlich; bei den Producern wurde die Spitze von ATCC 25827 mit sechsmaligem und ATCC 25826 mit fünfmaligem Abweichen eingenommen.

3.6. Ausschluß von Bakteriophagen

Jeder Producer wurde gegenüber mindestens einem Indikatorstamm nach Bakteriophagen überprüft. Es war aus der Literatur (29) bekannt, daß Lysogenität bei Providencia häufig vorkommt. In nicht wenigen Fällen entstand Verdacht auf Lysogenität insofern, als der Indikatorstrich 'angefressen' erschien: er wies rundliche bis ovale Aussparungen bzw. Verdünnungen des Wachstums dazu Reduktion des Pigmentes auf. Da jedoch das Wachstum im Bereich vorherigen Producerwachstums im Vergleich zum Außenbereich nicht oder allenfalls geringfügig vermindert war, wurden diese Fälle nur mit - oder -/+ bewertet.

Streicht man den Indikator über die ganze Fläche aus, so müßte das im Agar befindliche Bakteriozin als antibiotisch wirksames Makromolekül das Wachstum des sensiblen Stammes im Zentrum ganz oder, bei nicht ausreichender Konzentration, teilweise hemmen. Die Menge des Bakteriozins ist hierbei nicht vermehrbar. Phagen hingegen würden sich dabei vermehren, umliegende Indikatorzellen befallen und Plaques bilden. In die Peripherie verstrichene Phagen wären an ihrem Plaque erkennbar. Durch das Ausspateln in die Peripherie verschleppte Bakteriozinmoleküle hingegen würden verbraucht werden. Die Dichte des Bakterinrasens würde allenfalls diffus vermindert, die Bildung rundlicher, scharf begrenzter Aussparungen unterbleiben.

Wo offenbar zu Recht ein Bakteriozin als Ursache der Wachstums-
hemmung vermutet worden war, zeigte sich eine dem Bereich
des ursprünglichen Producerwachstums kongruente, im allgemeinen
scharf begrenzte Aussparung oder zumindest Reduzierung des
Indikatorrasens. Jede zufällig im Außenbereich angewachsene
Kolonie des Producers machte sich als Loch im Indikatorrasen
bemerkbar. In einigen Fällen jedoch überschritt die Hemmwirkung
die Zone vorherigen Producerwachstums. Dies äußerte sich in
einer der folgenden Weisen:

- 1.) Bei 0,25 µg Mitomycin/ml, in Fällen von Spontanproduktion
z.T. schon bei 0,05 µg/ml war die Grenze des Indikator-
rasens zum Zentrum der Platte unscharf und lag um einige mm
außerhalb der Grenze des Producerwachstumsbereiches. Bei den
niedrigeren Mitomycinkonzentrationen war sie jeweils noch
scharf. Dies traf für folgende Producer-Indikatorkombi-
nationen zu: Hed 125 gegen U G7, U G25 gegen Hed Jb,
U P40 gegen Hed Jb, Re 344 gegen Li 2, Re 1132 gegen
Hed Db, Re 1658 gegen U G7, Ros Va 1389/74 gegen Li 2.
Hier war der Indikatorstrich bei der manuellen Radial-
strichmethode ebenfalls über die Grenze vorherigen Producer-
wachstums hinaus gehemmt gewesen.
- 2.) Die Hemmwirkung überschritt die Grenze vorherigen Producer-
wachstums so erheblich, daß nur noch Einzelkolonien am
Rand der Platte zu finden waren. Dies traf zu für Dig 1622/73
als Producer gegenüber Hed Hb sowohl bei 0,05 µg Mitomycin/ml
wie bei 0,25 µg/ml, ferner für Bristol 7 gegenüber dem Indi-
kator Hed Hb zumindest bei 0,05 µg/ml, sowie für Re 1855
gegenüber Li 2 bei 0,25 µg/ml. In allen diesen Fällen
war bei der Radialstrichmethode der Indikator auf den Platten
entsprechender Mitomycinkonzentration nicht mehr angewachsen.
Es darf angenommen werden, daß es sich um diffundierende
Bakteriozine handelt. - Es sei angemerkt, daß sich die
Hemmwirkung des Producers Dig 1622/73 gegenüber U G7 -
im Gegensatz zu Hed Hb als Indikator (s.o.) - sowohl bei

der Radialstrichmethode als auch beim Ausspateln des Indikators über die ganze Platte auf den Bereich vorherigen Producerwachstums beschränkt. Der Indikatorrasen reicht hier bis zu seinem Rand und ist scharf begrenzt.

Durch Ausstreichen über die ganze Platte ließen sich auch die Unterbrechung des Indikatorwachstums am Übergang vom Zentrum zum Außenbereich sowie das bevorzugte Wachstum eines Indikators im Bereich vorhergehenden Producerwachstums verdeutlichen. Die Ergebnisse der manuellen Radialstrichmethode und des Ausspatelns über die ganze Platte korrelieren dabei wie Tab. 10 zeigt.

Tab.10: Korrelation der Ergebnisse der manuellen Radialstrichmethode mit denen bei Ausspateln des Indikators über die ganze Platte

Producer	Indikator	MC-Konzentrationen	Ergebnis Radialstrich	Ergebnis Ausspateln
Bristol 7	Abw 3.3	0 µg/ml	u	ringförmige Zone fehlenden Wachstums am Übergang der Zone ehemaligen Producerwachstums zum Außenbereich
		0,05 µg/ml	u	reduziertes Wachstum in der ringförmigen Zone
		0,25 µg/ml	u	reduziertes Wachstum in der ringförmigen Zone
Hed Bristol 1	U G1	0 µg/ml	+	stark reduziertes Wachstum im Innenbereich, scharfe Grenze, keine Plaques
		0,05 µg/ml	-	gleichmäßiger Indikatorrasen auf der gesamten Platte
		0,25 µg/ml	iv	Wachstum im Außenbereich stark reduziert, dagegen gut im Zentrum

Als Beispiele für Fälle vermutlicher Phagenaktivität wurden die Stämme U P54 (gegenüber U P47 als Indikator) sowie Hed Da (gegenüber Li 2) getestet. Es zeigten sich mit steigender Mitomycinkonzentration zunehmend Plaques im Innen-, aber auch im Außenbereich. Um sicher zu gehen, daß die Phagen nicht aus den Indikatorbakterien selbst stammten, wurde jeder Indikatorstamm auf vorher unbewachsenen Platten steigender Mitomycinkonzentration ausgespatelt.

Bei 8 Stämmen, bei denen Bakteriozine als hemmende Agentien vermutet worden waren, gab es Überraschungen (Tab.11).

Tab.11: Nachweis der Lysogenität bei vermeintlicher Bakteriozinwirkung.

Producer	Plaques bei Indikator	keine Plaques, typischer Bakteriozinbefund bei
Weih 287	U P44	Abw 3.3
Hed 125	U P44	U G7
Hed 143	U P44	Hed STHA
Hed Ha	Li 2	Ø
Sche O 311 701	U P47	Hed Hb
Dig 19 201/69	U P47	U P38
Dig 392/70	U P47	U P38
Dig 2925/70	U P47	U P38

Es wurden Plaques im Außenbereich gefunden. Bei 7 von ihnen ergab die Prüfung eines anderen Indikators dann doch einen für Bakteriozine typischen, phagenlochfreien Befund. Dies zeigt, daß diese Stämme sowohl Bakteriozine bilden als auch lysogen sind. Ob in den Fällen, in denen Phagen beteiligt sind, zugleich auch ein Bakteriozin gegen den selben Indikator gebildet wird, ist mit dieser Methode nicht entscheidbar. - Lediglich im Falle des vermeintlichen Producers Hed Ha (gegenüber Li 2 als Indikator),

bei dem Plaques festgestellt wurden, konnte nicht nachgewiesen werden, daß er auch ein Bakteriozin bildet, zumal auch kein weiterer Indikator zur Verfügung stand. Dieser Stamm wurde entsprechend aus der Statistik der Producer gestrichen. Die Anordnung der Plaques im Indikatorrasen hierbei erklärt auch, warum in diesem Fall die Radialstrichmethode im Gegensatz zu anderen lysogenen Stämmen ein '+' ergeben hatte. Weist nämlich etwa der Rasen des Indikators U P47 auf der vorher mit U P54 bewachsenen Platte gleichermaßen zahlreiche Plaques im Innen- und Außenbereich auf, finden sich solche im Rasen von Li 2 nach vorherigem Bewuchs mit Hed Ha fast nur im Innenbereich. Sie sind zudem auch merklich größer als die ersteren und erzeugen nahezu konfluierende Lysis. Am Übergang zwischen vorherigem Producerwachstum und Außenbereich konfluieren die Ränder der Plaques zu einer gezackten, aus zahlreichen kleinen Halbkreisen zusammengesetzten Linie.

3.7. Wirkungen von Providencia-, Proteus rettgeri- und Proteus morganii-Bakteriozinen auf Stämme der jeweils anderen beiden Arten

Die früher bei Proteus rettgeri (84) und hier bei Providencia gefundenen Bakteriozinproducer und -indikatoren ermöglichten es, die Hemmwirkung der Bakteriozine einer Spezies auf Stämme der anderen zu untersuchen. Die dritte nicht-schwärmende Proteusart, Proteus morganii, sollte mit einbezogen werden. Da wir von ihr noch keine Producer- bzw. Indikatorstämme kannten, mußte zunächst nach solchen gesucht werden.

3.7.1. Testung von Proteus morganii-Stämmen auf Bakteriozinbildung und -empfindlichkeit.

32 Stämme wurden als potentielle Bakteriozinproducer gegen die gleichen 32 sowie 16 weitere Stämme als potentielle Indikatoren mittels eines Multipoint-Inoculators (teilmechanisierte

Radialstrichmethode) getestet. Jeder als Producer getestete Stamm wurde auf Platten mit 0, 0,1 und 0,25 μ l Mitomycin/ml ausgestrichen.

Von den 32 als Producer getesteten Stämmen konnte bei 27 (84 %) eine Hemmstoffbildung gezeigt werden. 16 Stämme produzierten spontan (50 % des gesamten Materials bzw. 60 % der Producer). Faßt man Producer mit einem identischen Spektrum gehemmter Indikatoren zusammen, erhält man 19 Gruppen.

Von den 48 als Indikator getesteten Stämmen wurden 42 (87,5 %) durch wenigstens einen Stamm im Wachstum gehemmt. Nach Ausschluß gleich reagierender Indikatoren ergeben sich 33 differente Spektren.

Von den 32 Stämmen, die als Producer und Indikator gegeneinander getestet worden waren, übten 23 gleichzeitig eine Hemmwirkung aus und wurden gehemmt. Kein einziger Stamm war weder Producer noch Indikator.

Die angegebenen Häufigkeiten übertreffen, falls die relativ kleine Zahl der getesteten Stämme für die Spezies repräsentativ ist, deutlich diejenigen von *Proteus rettgeri* und *Providencia*. Es sei allerdings nochmals auf die Mitomycinempfindlichkeit vieler *Morganii*-Stämme hingewiesen, welche die Anwendbarkeit der Induktion hiermit einschränken kann.

3.7.2. Auswahl der Teststämme aus den drei Arten

Eine Testung aller bei den drei Spezies gefundenen Producer und Indikatoren wäre sehr umfangreich gewesen. Es wurde daher eine Auswahl getroffen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Beginnend mit einem Producer, der eine möglichst große Zahl von Indikatoren der gleichen Art hemmte, wurden weitere Producer so ausgewählt, daß sie möglichst viele zusätzliche uns bekannte Indikatoren hemmten. Endlich wurde jeder uns bekannte Indikator dieser Gattung durch wenigstens einen der ausgewählten Producerstämme gehemmt. - Bei der Auswahl der Indikatoren wurde analog verfahren.

Es ist darauf hinzuweisen, daß nicht ausschließlich breitspektrige Producer bzw. Indikatoren vertreten sind. So mußten beispielsweise einige Producer trotz eines sehr engen Spektrums nur deshalb einbezogen werden, weil sie Stämme hemmten, die durch Producer mit breitem Spektrum nicht gehemmt wurden. Die Anzahl der Producer bzw. Indikatoren, die aus diesem Grund in die Untersuchung einbezogen wurden, ist nicht bei allen drei Spezies die gleiche. Während bei *Proteus rettgeri* und *Providencia* jeweils 9 Producer bzw. 9 Indikatoren nötig waren, um jeden bekannten Indikator dieser Spezies damit wenigstens einmal zu erfassen bzw. jeden bekannten Producer zu entdecken, wären dies bei *Proteus morganii* nur 4 Producer und 7 Indikatoren gewesen. Aus Analogiegründen wurde aber ihre Anzahl ebenfalls auf jeweils 9 aufgestockt, wobei breitspektrige Producer bzw. Indikatoren hinzugefügt wurden. - Will man die Ergebnisse aber vergleichen, scheint es mir am ehesten vertretbar zu sein, die absolute Häufigkeit, mit der die ausgewählten 9 Indikatoren einer Gattung von den 9 Productern der gleichen Gattung gehemmt werden, zu betrachten und zu vergleichen, mit welcher Häufigkeit diese Indikatoren durch die 9 Producer einer anderen Spezies gehemmt werden.

3.7.3. Vergleich der Ergebnisse der manuellen und der teilmechanisierten Radialstrichmethode (Multipoint-Inoculator)

Da die *Morganii*-Stämme mit der Multipoint-Methode auf TSA getestet worden waren, die *Providencia*- und *Rettgeri*stämme hingegen auf MHA mit der manuellen Radialstrichmethode, mußte sichergestellt werden, daß beide Methoden und beide Nährmedien keine zu stark voneinander abweichenden Ergebnisse erzielten.

Daher wurde eine Auswahl von *Morganii*-Stämmen, die selben, die auch als Producer bzw. Indikatoren gegenüber *Rettgeri*- und *Providencia*stämmen vorgesehen waren, auch mit der manuellen Radialstrichmethode auf TSA getestet. Von 57 so überprüften Kombinationen fielen 51 (90 %) genauso aus wie mit der

Multipointmethode. Von den mit der manuellen Radialstrichmethode auf TSA getesteten Kombinationen wurden 52 auch auf MHA wiederholt. Dabei ergab sich Übereinstimmung in 46 Fällen (89 %).

Darüber hinaus wurden alle zwischen Providencia-, Rettgeri- und Morganii-Stämmen geprüften Kombinationen sowohl auf MHA wie auf TSA ausgeführt. Bei den dabei getesteten 486 Kombinationen gab es nur in 4 Fällen (0,8 %) eine Diskrepanz, die auch bei einer Wiederholung bestätigt wurde. In 3 Fällen ergab sich auf MHA ein positives, auf TSA ein negatives Ergebnis, in einem Fall verhielt es sich umgekehrt. Man kann hieraus schließen, daß die unterschiedliche Zusammensetzung von MHA und TSA in wenigen Fällen zu einem unterschiedlichen Ausmaß der Bakteriozinbildung führt. Bei der Auswertung wurden alle Fälle als positiv gewertet, die auf wenigstens einem Nährboden so reagiert hatten.

3.7.4. Ergebnisse der Kombinationen von Providencia-, Proteus rettgeri- und Proteus morganii-Stämmen

Wie Tab.13 zeigt, sind die Providenciabakteriozine in der Lage, jeden Rettgeriindikator wenigstens in einem Fall zu hemmen. Andererseits hemmen die Rettgeriproducer insgesamt 8 von 9 Providenciaindikatoren. Betrachtet man, wieviele Producer durch die Indikatoren der anderen Spezies erkannt werden, so sind dies 7 von 9 bei den Providenciaproducern und 8 von 9 bei den Rettgeriproducern.

Die Morganii-Stämme heben sich hiervon deutlich ab. Ihre Bakteriozine hemmen keinen Providenciaindikator und nur 2 von 9 Rettgeriindikatoren. Anders gesehen: Die Providenciaindikatoren entdecken keinen Morganii-Producer, die Rettgeriindikatoren lediglich einen.

Die Morganii-Indikatoren ihrerseits decken nur einen Rettgeriproducer auf, welcher 2 der 9 Morganii-Indikatoren hemmen kann.

Lediglich die Tatsache, daß 5 Providenciaproducer von Morganii-Indikatoren erkannt werden, fällt etwas aus der Reihe. Der Stamm Mor Kl38 allein war in der Lage, gleich 4 Providenciaproducer zu entdecken. Insgesamt sind es drei Morganii-Indikatoren, die von Providenciaproducern gehemmt werden.

Betrachtet man die Gesamtzahl positiver Kombinationen in den einzelnen Feldern, was aus oben angegebenen Gründen eher repräsentativ sein dürfte, ergeben sich die in Tab.12 angegebenen Zahlen positiver Interaktionen.

Tab.12: Häufigkeit positiver Interaktionen zwischen Bakteriozinproducer und -indikator bei jeweils neun als Producer bzw. Indikator verwendeten Stämmen

Indikatoren Producer	Providencia	Proteus rettgeri	Proteus morganii
Providencia	33/81	28/81	6/81
Proteus rettgeri	26/81	30/81	2/81
Proteus morganii	0/81	2/81	36/81

Hieraus wird wohl deutlich, wie viel näher sich *Proteus rettgeri* und *Providencia* bezüglich der Wechselwirkung ihrer Bakteriozine stehen als jede dieser beiden Spezies und *Proteus morganii*.

4. DISKUSSION

4.1. Material und Methoden

Stammzusammensetzung:

Entsprechend der Tatsache, daß *Providencia stuartii* im Hospitalmilieu weit überwiegt, umfaßt das bearbeitete Stammmaterial 162 *Providencia stuartii*-, dagegen nur 19 *Providencia alcalifaciens*-Isolate. Eine ausschließliche oder bevorzugte Wirkung der Bakteriozine einer Subspezies auf Stämme der gleichen Art deutet sich allerdings nicht an. Auch Al-Jumaili und Fenwick (9) unterschieden für Typisierungszwecke nicht zwischen den beiden.

Die Herkunft der verwendeten Stämme von 15 verschiedenen Quellen läßt hoffen, daß die Zahl der Kopien gering gehalten werden konnte. Die 22 Stämme von Hedges entstammen ihrerseits einer umfangreichen Sammlung zur Untersuchung der R-Faktoren (83). 78 der verwendeten 181 Isolate stammen aus einem Bereich (Malmö). Sie wurden in der Mehrzahl in drei Krankenhäusern dieser Stadt isoliert (179), wobei allerdings von jeder Station ein bestimmter Biotyp nur einmal berücksichtigt wurde. Der Autor schränkt selbst ein, daß eine Aussage über die allgemeine Inzidenz der von ihm beschriebenen ureasepositiven Stämme nicht möglich sei, da das Material nur ein sehr begrenztes Gebiet repräsentiere. Somit wären in diesem Material Kopien vielleicht in größerem Ausmaß zu erwarten. Bei den übrigen Gruppen fallen diese nicht so sehr ins Gewicht, da sich ihre Stammzahl auf maximal 17 (Lowbury) beläuft. Bei den *Proteus morganii*-Stämmen handelt es sich um verschiedene Serotypen von Dr. Rauss, Pécs..

Isolierung von Providenciastämmen aus Abwasser:

Die Methode nützt die nahezu 100%ige Polymyxinresistenz der Providenciastämme (71, 83, 171) aus, um durch Zusatz dieses Antibiotikums sensible Arten im Wachstum zu unterdrücken. Die hierzu verwendete Konzentration von 2,5 µg/ml orientiert sich an Wegener (183), der mit ihr einen polymyxinresistenten *Proteus rettgeri*-Stamm von einer empfindlichen *Salmonelle* trennen konnte. Die drei zunächst angewandten biochemischen Tests (Laktosespaltung, Phenylalanindeaminase, Urease) sollen nach Milner (114) ausreichen, um *Providencia* mit Sicherheit zu identifizieren. Dies konnte durch den folgenden Einsatz der Bunten Reihe (*api*) bestätigt werden. Wie zu erwarten war, handelte es sich bei den Abwasserstämmen um *Providencia alcalifaciens*, die in den Faeces dominiert (s. Einleitung).

Methodik des Bakteriozinnachweises:

Sie folgt derjenigen, die Hellinger (84) bei *Proteus rettgeri* angewandt hat. Der von ihr als optimal erkannte 1,5 %ige Mueller-Hinton-Agar wurde auch hier verwendet. Die Testung der *Morganii-Rettgeri-Providencia*-Kombinationen wurde sowohl auf MHA als auch auf TSA durchgeführt und ergab auf beiden Nährböden gleich gut ablesbare Ergebnisse. In 3 Fällen lag lediglich auf MHA ein positives Ergebnis vor, in einem Fall nur auf TSA. Diese Abweichungen erscheinen mir zu gering, um einem der beiden Nährböden eindeutig den Vorzug zu geben. - Peptonagar wurde nicht verwendet. Bereits Hellinger hatte auf Peptonagar keine Hemmstoffbildung nachweisen können. Ihre Angaben decken sich hierbei mit McGeachie und Cormick (109) und Al-Jumaili (8), die feststellten, daß Pepton die Ausbeute an Bakteriozin herabsetzt, sowie mit Coetzee (33), dem mit Nähragar und Difco Nährbouillon kein Bakteriozinnachweis bei *Proteus morganii* und *Providencia* gelang.

Die hier vorliegende Arbeit hat sich um eine weitgehende Standardisierung der Bedingungen bemüht. Agarvolumen, Producer- und Indikatorinokulum, Bebrütungsdauer und -temperatur waren stets die gleichen. Hierbei wird die Erkenntnis von Bauernfeind et al. (12) bei *Pseudomonas aeruginosa* berücksichtigt, daß zu geringe Agarvolumina (< 10 ml) falsch positive, zu große Agarvolumina (> 30 ml) leicht falsch negative Ergebnisse liefern können. Auch der von Bergan (14) und Bauernfeind et al. (12) hervorgehobenen Bedeutung einer nicht zu hohen Indikatordichte wurde Rechnung getragen, indem stets eine Indikatorsuspension der OD 0,030 verwendet wurde. Eine noch niedrigere optische Dichte erscheint nicht empfehlenswert, zumal bei etwas mitomycinempfindlichen Indikatoren auf mitomycinhaltigen Platten, da sonst ein sicheres und deutliches Anwachsen der Bakterien nicht mehr gewährleistet ist. - Die Bebrütung der Producer erfolgte stets genau über 16 h bei 32°C . Dies dürfte nicht ohne Bedeutung sein: So führten Gillies und Govan (68) ihre wesentlich besseren Ergebnisse bei der Typisierung von *Pseudomonas aeruginosa* als Darrell und Wahba (42) auf eine Verkürzung der Inkubationszeit von 24 h auf 14 hrs sowie die Senkung der Bebrütungstemperatur von 37° auf 32°C zurück. Auch George (66) erkannte bei *Proteus mirabilis*, Anderhub et al. (10) bei *Serratia marcescens*, daß eine niedrigere Bebrütungstemperatur als 37°C eine wesentlich bessere Bakteriozinausbeute bringt.

4.2. Häufigkeit der Bakteriozinbildung bei *Providencia* und *Proteus morganii*

Die Angabe, daß 45,3 % des untersuchten Stammmaterials Bakteriozine bilden, ist, wie schon im Ergebnisteil bemerkt, zwiespältig, da bei den Stämmen von Dr. Ursing nur in 14 %, bei den übrigen jedoch in 69 % Hemmstoffbildung beobachtet werden konnte. Vielleicht

ist die Existenz von Kopien unter den Ursingstämmen hierfür mitverantwortlich. Allerdings gab es unter den 11 nachgewiesenen Producern aus diesem Material keine zwei mit gleichem Spektrum, noch stimmten zwei oder mehr der 14 hierbei gefundenen Indikatoren (von 32 getesteten) in ihrer Empfindlichkeit überein. Recht unterschiedliche Angaben verschiedener Autoren über die Häufigkeit der Bakteriozinogenie bei einer Spezies sind allerdings keine Seltenheit (vgl. 20).

Coetzee (33) hat als bisher einziger die Bakteriozinbildung bei Providencia in vergleichbarer Weise untersucht, allerdings bei nur 37 Stämmen und ohne von vornherein zu induzieren. Er verwendete MacConkey-Agar als Nährboden. Phagen schloß er dadurch aus, daß er klare Hemmzonen herauschnitt, sie mit dem Indikator bebrütete und durch Auftropfen des Überstandes auf Indikatorkulturen prüfte, ob sich die Fähigkeit zur Bakterizidie vermehrt hatte. Er erhielt insgesamt 5 Producer, das sind 13,5 % der Stämme. Ohne Induktion konnte er freilich nur die Spontanproducer entdecken. Diese belaufen sich im hier vorliegenden Material auf 21 (11,6 %) bzw. 18,4 % bei Ausschluß der Ursingstämmen. Damit liegen die Zahlen recht nahe bei den von Coetzee gefundenen. - Stickler und Thomas (167) fanden zwar bei 69 von 74 Stämmen nach Induktion mit Mitomycin C im Überstand der Flüssigkultur hohe Titer an Bakteriophagen oder Bakteriozinen, unterschieden aber nicht zwischen beiden. - Al-Jumaili und Fenwick (9) geben nur an, daß sie 300 Stämme als Producer nach Induktion mit Mitomycin C testeten, nicht aber, wie häufig sie Producer fanden. Auch trifft diese Arbeit wohl der selbe Einwand, den Senior (157) bereits gegenüber der Arbeit Al-Jumailis über die Bakteriozintypisierung von *Proteus vulgaris* und *mirabilis* (5) erhoben hatte: daß nämlich Phagen nicht ausgeschlossen worden waren.

Die Testung von 32 *Proteus morganii*-Stämmen als potentielle Producer gegen 48 Stämme der gleichen Art als mögliche Indikatoren erbrachte 84 % Producer bzw. 50 % Spontanproducer sowie 87,5 % Indikatoren. Von den bisherigen Untersuchern fanden Coetzee (33) ohne Induktion bei 12 von 94 Stämmen (12,7 %) Hemmstoffbildung, Senior (157) bei nur 3 von 26 Stämmen. Nur 6 dieser 26 Stämme reagierten als Indikatoren. Sollte der in der vorliegenden Arbeit gefundene Anteil für die Spezies eher repräsentativ sein, könnte der Schluß von Brandis und Smarda (20), eine Bakteriozintypisierung dieser Art sei wegen der Seltenheit der Bakteriozinbildung kaum zu erwarten, wohl nicht mehr aufrechterhalten werden.

Sowohl unter den *Providencia*- wie *Proteus morganii*-Stämmen könnten sich durchaus noch mehr Producer befinden, deren Bakteriozine allerdings auf keinen der bisher verwendeten Indikatoren wirken. So deckte die Testung der Scheringstämmen gegeneinander zwei Producer auf (Sche O 112 707, Sche 1 011 710), die mit den 33 sonst verwendeten Indikatoren nicht entdeckt worden waren. Einer der hierbei gefundenen Indikatoren, Sche O 204 701a, konnte bei einer zusätzlichen Testung einen bisher unerkannten Producer (U P79) als solchen identifizieren. Allerdings ist zu erwarten, daß die Suche nach weiteren Productern mit weiteren Indikatoren bei steigendem Aufwand immer weniger neue Producer erbringt.

Die Bakteriozinbildung bei sehr mitomycinempfindlichen Stämmen, die nicht schon spontan produzieren, ist leider nicht nachweisbar, da durch die Wachstumshemmung die Zahl möglicherweise bakteriozinbildungsfähiger Zellen erheblich reduziert wird.

4.3. Auffälligkeiten bei der Untersuchung auf Bakteriozinbildung

Für die Bewertung am einfachsten sind die Fälle vollständiger Hemmung des Indikatorwachstums im Bereich vorherigen Producerwachstums bzw. ungeminderten Wachstums in diesem Bereich. In

der Tat finden sich aber nicht selten Einzelkolonien bzw. schwaches konfluierendes Wachstum dort, wo zuerst der Producer gewachsen war. Die Bewertung einer Hemmung um mehr als die Hälfte als $\pm$, um weniger als die Hälfte als $-/+$ bringt die begrenzte Quantifizierbarkeit zum Ausdruck. Ursachen für eine solche teilweise Hemmung können entweder eine zur Abtötung aller Indikatoren zu geringe Bakteriozinmenge oder die unterschiedliche Empfindlichkeit bzw. Resistenz eines Teils der Indikatorbakterien sein.

Das Auftreten einer Hemmung des Indikatorwachstums nur am Übergang des Wachstumsbereiches eines Producers in den Außenbereich ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden. Abbott und Shannon (1) beobachteten dieses Phänomen bei *Shigella sonnei* und bezeichneten es als die Bildung von "D-Zonen". Wahba (181) fand solche bei *Pseudomonas* und führte sie auf eine, zeitlich nach der Pyocinbildung erfolgte, Produktion pyocin-inaktivierender Substanzen zurück. Bei Gillies und Govan (68) traten sie nach Änderung von Inkubationszeit und -temperatur kaum noch auf. Cradock-Watson (39) fand D-Zonen, allerdings selten, bei *Proteus mirabilis*, Coetzee (33) bei *Providencia* und *Proteus morganii*. Nach Induktion mit UV-Licht gelang es letztgenanntem, klare Hemmzonen zu erzielen. Dastidar et al. (43) schließlich nennen die Erscheinung, die sie bei Staphylokokken beschreiben, "paradoxe Inhibition" und führen sie darauf zurück, daß die im Zentrum wachsenden Bakterien durch Transformation die Fähigkeit zur Bakteriozinogenie und Bakteriozinresistenz erworben hätten. - Im vorliegenden Material war dieses Phänomen, das allerdings auch selten auftrat, durch Induktion im allgemeinen nicht zu beseitigen. Teilweise ging sogar ein spontanes "+" nach Induktion in eine D-Zone über (z.B. B7 gegen Abw 4.7); auch Variationen zwischen "+" und "u" kamen in Einzelfällen bei Wiederholungen vor. Es steht somit außer Zweifel, daß ein Bakteriozin die Ursache der Erscheinung ist. Für die Typisierung ist sie allerdings schlecht verwertbar, da sie leicht übersehen werden kann und bei Ver-

wendung des Multipoint Inoculator überhaupt nicht erkennbar wäre.

Die Bakteriozinbildung ist zwar im allgemeinen als induzierbar bekannt, dies gilt aber nicht ausnahmslos (20, 141). Auch im hier bearbeiteten Material gibt es einige spontanproduzierende Stämme (B7, Hed Bristol 1, Hed Graves 3, U P40, Re 1132, Sche 1 Oll 706), die bei höherer Mitomycinkonzentration trotz anscheinend unveränderten Wachstums einige Indikatoren in geringerem Maße oder gar nicht mehr hemmen. Die Tatsache, daß hiervon stets nur ein Teil der Indikatoren betroffen ist, könnte auf die Bildung von zwei (oder mehr) verschiedenen Bakteriozinen, die teils induzierbar, teils nicht induzierbar sind, zurückzuführen sein, oder auf die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Indikatoren bei einer verringerten Bakteriozinmenge. Die verminderte Bildung von Bakteriozin könnte auch durch die Freisetzung eines (nicht entdeckten) Phagen durch Induktion bedingt sein, da Lysogenie und Bakteriozinogenie sich gegenseitig begrenzen (Exklusion); dabei sind zur Phageninduktion stets höhere Dosen an Induktionsmittel nötig als zur Bakteriozininduktion (20).

Die Hemmung eines Producers durch sein eigenes Bakteriozin, zumal nach Induktion, ist zwar schon beschrieben worden (149), wird aber nicht häufig berichtet. Einige Autoren vermerken das Fehlen dieser Erscheinung ausdrücklich (33, 38, 173). Im vorliegenden Material konnte in einem Fall, bei Abw 4.3, nach Induktion wiederholt eine teilweise Hemmung von Bakterien des gleichen Stammes gezeigt werden.

Das unterschiedliche Produktions-/Sensibilitätsmuster von kulturmorphologisch unterschiedlichen Formen aus einer uns übersandten Probe ist schwer zu deuten, da uns unbekannt ist, ob es sich um Varianten bzw. Mutanten eines Stammes oder um die Mischkultur zweier differenten Stämme handelt. Daß Zusammenhänge zwischen rauher und mukoider Kolonieform und Bakteriozinbildung bzw. -empfindlichkeit vorkommen können, haben Yamamoto et al. (188) bei *Streptococcus mutans* gezeigt.

Das Auftreten von Phagen, die durch die Induktion zu einem lytischen Zyklus angeregt wurden, läßt sich bei Anwendung der manuellen Radialstrichmethode meist erkennen. Von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen (Hed Ha), scheint dabei das Wachstum im Zentrum der Platte kaum geringer zu sein als im Außenbereich, so daß eine Verwechslung mit Bakteriozinen selten sein dürfte. - In den Fällen, wo beim Ausstreichen eines Indikators über die ganze Platte Phagenlöcher auftraten, bei Verwendung eines anderen Indikators dagegen keine, kann man nicht sicher sagen, ob im ersten Fall nicht ein Bakteriophage und ein Bakteriozin auf den gleichen Stamm wirken. Die scharfe Begrenzung des Übergangs vom Zentrum der Platte zum Außenbereich läßt dies zwar vermuten, ein Beweis ließe sich aber nur nach Trennung von Bakteriozin und Bakteriophagen, z.B. im Saccharosegradienten, führen. - Das Ergebnis dieses Versuches beweist jedenfalls das Auftreten von bakteriozinogenen und zugleich lysogenen Stämmen bei Providencia. Lysogenie bei Providencia ist nach Coetzee (29) häufig (62 %). Wie bei *Proteus mirabilis* (45) scheinen Bakteriozinogenie und Lysogenie unabhängig voneinander vorzukommen.

Bezüglich der stofflichen Natur der gefundenen Bakteriozine, d.h. ob es elektronenoptisch amorphe Proteine oder Phagenpartikel sind, läßt die Arbeit nur indirekt eine Aussage zu. Bei den diffundierenden Bakteriozinen, die das Indikatorwachstum sowohl bei der manuellen Radialstrichmethode als auch beim Ausspateln über die gesamte Platte auch außerhalb des Bereichs vorherigen Producerwachstums hemmen, dürfte es sich um niedermolekulare Substanzen handeln, da die Diffusionsfähigkeit auch eine Funktion des Molekulargewichtes ist.

Bei Coetzee (33) finden sich erste Hinweise, daß die untersuchten Bakteriozine nicht dialysierbar waren, durch Zentrifugation bei 24 000 g über 2 hrs nicht angereichert werden

konnten, bei 65°C nach 30 min inaktiviert wurden und gegenüber bakteriellen Proteasen empfindlich waren. - Ein von Smit et al. (161) untersuchtes Morganocin war ein elektronenmikroskopisch amorphes Glykoprotein, wohingegen näher untersuchte Rettgerocine (176, Bauernfeind, unveröffentlichte Ergebnisse) Phagenschwanzstruktur besaßen. Letzteres trifft auch für die von Al-Jumaili (7) und Coetzee (34) untersuchten Bakteriozine von *Proteus mirabilis* und *vulgaris* zu.

4.4. Anwendung der Bakteriozinbildung zur Typisierung

Eine Typisierung von Stämmen unter Verwendung von Bakteriozinen ist grundsätzlich auf zweierlei Weise möglich:

- 1.) Untersuchung der Bakteriozinbildung gegenüber Standardindikatoren,
- 2.) Untersuchung der Empfindlichkeit gegenüber Standardbakteriozinen.

Der große Vorteil einer Bakteriozinotypie im Gegensatz zur Lysotypie und Serotypie ist der geringe zu ihrer Durchführung nötige Aufwand (172). Dies trifft besonders auf die Typisierung im festen Medium zu. Um Isolate mit zellfreien Bakteriozinlysaten zu typisieren, müssen solche erst hergestellt werden (5,9). Um ihren Titer bei längerer Aufbewahrung zu erhalten, bedarf es ständiger Kontrollen und ggf. des Zusatzes von Stabilisatoren (58). - Ferner ist zu bedenken, daß sich in den Überständen von Flüssigkulturen, zumal nach Induktion, mit großer Wahrscheinlichkeit auch Phagen befinden. Für epidemiologische Zwecke ist es zwar im Prinzip unerheblich, ob die Typisierung durch Bakteriozine allein oder ein Gemisch aus Bakteriozinen und Bakteriophagen erfolgt. Es ist allerdings der Hinweis von Farmer III und Herman (56) in Betracht zu ziehen, daß zumindest bei *Pseudomonas aeruginosa*

Pyocinproduktion und -empfindlichkeit sowie Phagenbildung stabile genetische Merkmale waren, jedoch häufig Mutationen bezüglich der Phagenempfindlichkeit vorkamen. - Darüber hinaus ist zu prüfen, ob epidemiologisch verwandte Stämme auch in der Bakteriozinempfindlichkeit übereinstimmen, was nicht stets der Fall zu sein scheint (38). Abbott und Shannon (1) gaben ihren Versuch, *Shigella sonnei* nach der Bakteriozinempfindlichkeit zu typisieren, zugunsten einer Typisierung nach der Bakteriozinbildung auf, da im ersten Fall epidemiologisch verwandte Stämme ungleich reagierten.

Das Ziel dieser Arbeit war neben der Untersuchung der Häufigkeit der Bakteriozinproduktion bei Providencia die Beantwortung der Frage, ob diese Eigenschaft für eine Typisierung genutzt werden könnte. Eine abschließende Antwort scheint mir noch nicht möglich: Würde in einem künftigen Untersuchungsmaterial Bakteriozinbildung nur in etwa 45 % vorkommen, wie das der Gesamtrelation bei den hier bearbeiteten Stämmen entspricht, käme eine Typisierung anhand der Bakteriozinogenie nur als eine hin und wieder ergänzend mögliche Methode in Betracht. Würde der Anteil der Producer aber um 70 % liegen, wie es bei den vorliegenden Stämmen unter Ausschluß der Stämme von Dr. Ursing der Fall ist, dürfte ein solches Typisierverfahren wohl eher Bedeutung gewinnen. Der Anteil typisierbarer Stämme wäre zwar geringer als bei *Pseudomonas aeruginosa* (88,4 %) (68), läge aber etwa in dem Bereich, wie er für *Shigella sonnei* (etwa 2/3) (1) oder *Proteus (mirabilis)* ermittelt wurde (knapp 60 %) (39). Die Typisierung von Providencia unter Verwendung ihrer Bakteriozinproduktion wäre also wohl einen Versuch wert.

Die Tatsache, daß mehrere Stämme eines Senders (Pot I, Pot III und Pot IV; Dig 19 201/69, Dig 392/70 und Dig 2925/70, Low 76/8236 bis Low 76/8790 (12 Stämme) sowie Low 77/4661 bis Low 77/5093 (4 Stämme)), die wohl den laufenden Einsendungen an ein bakteriologisches Laboratorium entstammen, Bakteriozine

gleichen Hemmusters bildeten, scheint mir ein erster wichtiger Hinweis auf die Anwendbarkeit einer Typisierung nach Bakteriozinogenie.

Bei einer zukünftigen praktischen Durchführung wird man wohl versuchen, die Zahl der Indikatoren (bisher 33) zu reduzieren, um den Aufwand zu vermindern; dabei sollte die Differenzierungsfähigkeit zwischen verschiedenen Mustern möglichst erhalten bleiben. Indikatoren, die häufig variable Ergebnisse liefern, sind zu eliminieren. Auch auf mitomycinempfindliche Indikatoren sollte nach Möglichkeit verzichtet werden. Allerdings sind die etwas mitomycinempfindlichen Indikatoren Li 2, Hed Hb und ATCC 12013 derzeit aufgrund ihres außergewöhnlich breiten Spektrums noch unersetzbar. Die Suche nach weiteren empfindlichen Stämmen, erleichtert durch das Aufbringen der Indikatoren mit dem Multipoint Inoculator, könnte hier weiterhelfen. - Für vorläufige Typisierungsversuche seien die 9 Indikatoren empfohlen, die zur Aufdeckung möglicher Rettgeri- und Morganiiproducer verwendet wurden. Ihre Anwendung würde alle bisher gefundenen Producer erkennen; allerdings könnten sie nicht mehr so gut differenziert werden. Die mit ihnen erzielbaren Muster lassen sich leider nicht vollständig angeben, da die Indikatoren Sche O 204 701a und Sche 1 011 710 nur bei einem Teil der Stämme getestet wurden. Bei der großen Zahl verschiedener Muster und der Vorläufigkeit der Ergebnisse wäre eine solche Definition von Productertypen auch nur von geringem Nutzen.

Mit Hilfe der bisher gefundenen Producer könnte man auch versuchen, eine Typisierung nach Bakteriozinempfindlichkeit zu entwickeln, wie sie Bauernfeind et al. für *Klebsiella pneumoniae* (13) und *Proteus rettgeri* (Bauernfeind, unveröffentlichte Ergebnisse) erarbeiteten. Auch an eine Typisierung nach Bakteriozinbildung und -empfindlichkeit, wie sie Senior (157) bei *Proteus* bzw. Farmer III und Herman (56) bei *Pseudomonas aeruginosa* durchführten, ließe sich dann denken. Über ein

mögliches gemeinsames Typisierschema für *Proteus rettgeri* und *Providencia s. unten* !

4.5. Reproduzierbarkeit

Um sinnvoll typisieren zu können, müssen die Ergebnisse reproduzierbar sein. Mehrmalige Überprüfung der Laborstämme bzw. wiederholte Proben des gleichen Patienten müssen die selben Ergebnisse liefern. - Da hierbei die Kulturbedingungen bedeutsam sein können, wurde für ihre Standardisierung gesorgt. Bakteriozinbildung bzw. -empfindlichkeit gelten als genetisch stabile Merkmale. Allerdings sind Mutationen, die zum Verlust des Col-Faktors und damit auch zu Bakteriozinempfindlichkeit oder aber zu Resistenz oder Toleranz gegenüber Bakteriozinen führen, möglich. - Auch kann, entsprechend der Variabilität biologischen Materials, die Colicinausbeute trotz einer Standardtechnik bei Wiederholungen um den Faktor 1000 schwanken (111). Diese Autoren, wie auch Bergan (14), berichten ferner über Empfindlichkeitsänderungen der Indikatoren bei Aufbewahrung im Laufe der Zeit. Das Ausmaß der Variabilität scheint nicht bei allen Producern und Indikatoren gleich zu sein. Craddock-Watson (39) fand bei *Proteus (mirabilis)* 3 stabile Producertypen neben anderen, die bei der Wiederholung in vielen Fällen Variationen im Hemmuster lieferten. Abbott und Shannon (1) sowie Gillies (67) fanden variable Indikatoren bei *Shigella sonnei*. Diese Befunde decken sich voll mit den unsrigen, daß bestimmte Producer bzw. bestimmte Indikatoren besonders leicht variieren. Diese Variationen laufen hierbei nicht stets ohne Gesetzmäßigkeit ab: So variierten 12 Low-Stämme, die in identisches Hemmuster aufwiesen, gemeinsam gegenüber den Indikatoren Abw 3.3, ATCC 25828 und U G7. Man wird versuchen, solche Indikatoren zu eliminieren, sobald sie ersetzbar sind. Gillies (67) mußte in sein Typisierschema von *Shigella sonnei* allerdings auch

2 Indikatoren aufnehmen, deren Verhalten gegenüber einigen Producern er als v (= variabel) bezeichnete.

Die Angaben über die Reproduzierbarkeit von Typisiererergebnissen schwanken in der Literatur. Sie reichen von "vollständiger Reproduzierbarkeit" (5, 173) über Abweichungen von weniger als 10 % (70, 110) bis zu fast 50 % Abweichungen im Muster (10). Buffenmyer et al. (24), die Klebsiellen typisierten, fanden Abweichungen in fast 20 % und bezeichneten die Reproduzierbarkeit als das Hauptproblem der Bakteriozintypie. - Die Angaben über sehr gut reproduzierbare Ergebnisse sind nicht ohne Vorsicht zu betrachten; so fanden Anderhub et al. (10) bei ihrer Arbeit mit *Serratia marcescens* nach der Methode von Traub et al. (173) bei Wiederholungen im Gegensatz zu diesem Abweichungen im Hemmuster in etwa 1/3 der Fälle.

Aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Wiederholungen läßt sich nur bedingt auf die Reproduzierbarkeit schließen, da kein systematischer Ansatz zu ihrer Untersuchung gemacht wurde. Vergleicht man dennoch die Häufigkeit von Abweichungen unter den wiederholten Kombinationen (14 %) mit den Angaben anderer Autoren bei anderen Arten, liegt das Ergebnis im mittleren Bereich. Vielleicht wären mit einem noch geeigneteren Nährboden und anderen Kulturbedingungen noch bessere Ergebnisse zu erzielen.

4.6. Verwandtschaft von *Providencia*, *Proteus rettgeri* und *Proteus morganii*

Das Wirkungsspektrum von Bakteriozinen, die typischerweise auf Stämme der gleichen oder nahe verwandter Arten bakterizid wirken, wurde schon von Hamon und Péron (78) als Hilfsmittel zur Bakterienklassifikation verwendet. Die hier im wesentlichen angewandte Methode, vielfach empfindliche Indikatoren auszuwählen, um sie gegen Producer anderer Arten zu testen, sowie breitspektrige Producer gegen Indikatoren anderer Arten

zu verwenden, wurde auch schon von Hamon und Péron (79) bei Enterobacteriaceen durchgeführt. - Da die systematische Stellung von *Proteus morganii*, *Proteus rettgeri* und *Providencia* aufgrund ihrer biochemischen Leistungen allein umstritten ist, kommt anderen Parametern, wie der Wirkung der Bakteriozine auf die jeweils anderen beiden Spezies, erhöhte Bedeutung zu. Die Ergebnisse legen recht deutlich eine enge Verwandtschaft von *Proteus rettgeri* und *Providencia* nahe, wohingegen *Proteus morganii* sich von den beiden anderen Spezies zumindest in Bezug auf die seltene Wechselwirkung der Bakteriozine sichtlich abhebt.

Dies deckt sich mit weiteren bekannten Gemeinsamkeiten von *Proteus rettgeri* und *Providencia* sowie Unterschieden dieser beiden Arten gegenüber *Proteus morganii*. Am auffallendsten ist der GC-Gehalt der DNA (22, 85), der bei *Proteus morganii* je nach Autor 53 % bzw. 51-51,5 % beträgt, bei *Proteus rettgeri* mit 39,5-42 % und *Providencia* mit 40-42 % jedoch fast identisch ist. - Auch die Antibiotikaresistenz von *Proteus morganii* unterscheidet sich in der Mehrzahl von der anderer Proteusarten. So sind etwa die Hälfte der *Morganii*-Stämme tetracyclinempfindlich und über 80 % nitrofurantoinempfindlich (171), wohingegen *Proteus rettgeri* und *Providencia* gegen diese Antibiotika fast stets resistent sind. - Coetzee (29) ließ temperente sowie aus Abwasser isolierte Phagen von *Providencia* auf *Proteus rettgeri* und *Proteus morganii* einwirken. Keiner der 23 temperenten Phagen wirkte auf die 17 *Morganii*-Stämme, hingegen 9 dieser Phagen auf 25 *Proteus rettgeri*-Stämme. Die 34 Abwasserphagen lysierten lediglich 6 *Morganii*-Stämme, hingegen 21 *Rettgeri*-Stämme. Coetzee wertete dieses Ergebnis als Argument, *Providencia* in die *Proteus*-Gruppe einzubeziehen. Darüber hinaus zeigt sich die engere Verwandtschaft von *Providencia* mit *Proteus rettgeri* als mit *Proteus morganii*. - Der selbe Autor hat auch eine Arbeit über die "host-range" von *Proteus morganii*-Phagen veröffentlicht. Diese hatten ein ungewöhnlich breites Spektrum,

wirkten auf die übrigen *Proteus*stämme einschließlich *Providencia* sowie auf *E. coli* und Shigellen. Coetzee diskutierte daher eine intermediäre Position von *Proteus morganii*.

Es wäre ein Gegenstand weiterer Forschung, Bakteriozine von *Proteus mirabilis* und *vulgaris* mit Stämmen der nichtschwärmen- den *Proteus*arten in Wechselwirkung treten zu lassen und vice versa. Ferner ließen sich Colicine von *E.coli*, Salmonellen und Shigellen in die Untersuchung einbeziehen bzw. Stämme dieser Gattungen als Indikatoren benützen. Dies könnte im Verein mit anderen Parametern helfen, die verwandtschaftlichen Verhältnisse dort zu klären, wo die Biochemie allein nicht ausreicht.

In der Praxis könnte man die (fast) gleich häufige Wirkung der Bakteriozine von *Proteus rettgeri* und *Providencia* auf Stämme der eigenen wie der anderen Art dazu nutzen, ein gemeinsames Typisierschema für diese beiden Arten auszuarbeiten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Enterobakteriaceengattung *Providencia* wurde die Bildung von Bakteriozinen spontan und nach Induktion mit Mitomycin C im festen Medium mit Hilfe der manuellen Radialstrichmethode untersucht. 73 Stämme wurden gegeneinander als potentielle Bakteriozinproducer bzw. -indikatoren getestet. Insgesamt bildeten 82 von 181 Stämmen (45,3 %) ein Bakteriozin, 21 auch ohne Induktion. Es konnte ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um Bakteriophagen handelte. Eine Anwendung der Bakteriozinbildung als epidemiologischer Marker (Bakteriozinotypie) erscheint demnach prinzipiell möglich.

Daneben wurde die Wirkung von *Providencia*-, *Proteus rettgeri*- und *Proteus morganii*-Bakteriozinen auf Stämme der jeweils anderen beiden Arten untersucht, um eine Aussage über ihre Verwandtschaft zu machen. Es zeigte sich, daß sich *Providencia* und *Proteus rettgeri* hinsichtlich ihrer Bakteriozine verwandtschaftlich wesentlich näher stehen als jede dieser beiden Arten und *Proteus morganii*.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbott, J.D., Shannon, R.: A method for typing *Shigella sonnei*, using colicine production as a marker. J.Clin. Pathol. 11 (1958) 71-77
2. Adler, J.L., Burke, J.P., Martin, D.F., Finland, M.: *Proteus* infections in a general hospital. I. Biochemical characteristics and antibiotic susceptibility of the organisms. Ann.Int.Med. 75 (1971) 517-530
3. Allen, J.C., Kelly, P.C.: Antigenetic heterogeneity among pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity 12 (1975) 318-323
4. Allen, J.C., Kelly, P.C.: Evidence for antigenetic differences among pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Trans.Amer.Clin.Climat.Ass.86 (1975) 51-58
5. Al-Jumaili, I.J.: Bacteriocine typing of *Proteus*. J.Clin.Pathol. 28(1975) 784-787
6. Al-Jumaili, I.J.: An evaluation of two methods of bacteriocine typing of organisms of the genus *Proteus*. J.Clin.Pathol. 28 (1975) 788-792
7. Al-Jumaili, I.J.: Physical properties and the fine structure of proteocines. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 235 (1976) 421-432
8. Al-Jumaili, I.J.: An investigation into factors affecting proteocine production by *Proteus* isolates. Zbl.Bakt.Hyg.I. Abt.Orig.A 236 (1976) 113-119
9. Al-Jumaili, I.J., Fenwick, G.A.: Bacteriocine typing of *Providencia* isolates. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 240 (1978) 202-207

10. Anderhub, B., Pitt, T.L., Erdman, Y.J., Willcox, W.R.:
A comparison of typing methods for *Serratia marcescens*.
J.Hyg. (Cambr.) 79 (1977) 89-102
11. Bauernfeind, A., Burrows, J.R.: Suggested procedure
allowing use of plastic petri dishes in bacteriocin
typing. Appl.Environ.Microbiol. 35 (1978) 970
12. Bauernfeind, A., Petermüller, C., Burrows, J.R.: Modifi-
ziertes Verfahren zur Pyocintypisierung von *Pseudomonas*
aeruginosa. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 240 (1978) 271-278
13. Bauernfeind, A., Petermüller, C., Schneider, R.: Bacteriocins
as tools in analysis of nosocomial *Klebsiella pneumoniae*
infections. J.Clin.Microbiol. 14 (1981) 15-19
14. Bergan, T.: Typing of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocine
production. Acta Pathol.Microbiol.Scand. 72 (1968) 401-411
15. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition.
Ed. by Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. Williams and Wilkins,
Baltimore, 1974
16. Berkman, E.: *Providencia* isolated from the stools of patients
with gastroenteritis. Mikrobiyol.Bul. 10 (1976) 307-311
17. Bhat, P., Myers, R.M., Feldman, R.A.: Providence group of
organisms in the aetiology of juvenile diarrhoea. Indian
J.Med.Res. 59 (1971) 1010-1018
18. Bhat, P., Shanthakumari, S., Myers, R.M.: The Providence
group: Subgroups including biotypes and serogroups of
faecal strains isolated in Vellore. Indian J.Med.Res. 59
(1971) 1184-1189
19. Bradley, D.E.: Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins.
Bact.Rev. 31 (1967) 230-314
20. Brandis, H., Smarda, J.: Bacteriocine und bacteriocin-
ähnliche Substanzen. Fischer, Jena, 1971.

10. Braun, H., Kewenau, F.: Über den *Bacillus mooseri*.
Zbl.Bakt.I.Abz.Orig. 91 (1913/4) 1 (zit. nach (1961))
11. Brenner, D.J., Farmer III, J.J., Fanning, G.R., Steiger-
walt, A.G., Klykken, R., Mathen, H.G., Hickman, F.W.,
Swing, W.W.: Desoxyribonucleic acid relatedness of *Proteus*
and *Providencia* species. Int.J.Spec.Bacteriol. 18 (1975)
169-182
12. Brühl, F., Müller, U.: Harnwegsinfektionen durch den
Erreger *Providencia* als Hospitalisierungsfolge. Münchner
Med.Wochenschrift 108 (1966) 467-468
13. Buffenmyer, C.L., Rycheck, R.R., Yee, R.S.: Bacteriocin
(Klebsocin) sensitivity typing of *Klebsiella*. J.Clin.Microbiol.
4 (1976) 139-144
14. Chevereau, M., Daniels, F.J.L., Davies, J., Le Goffic, F.:
Aminoglycoside resistance in *Bartella* mediated by gentamicin
acetyltransferase II: an enzyme modifying the C amino groups
of aminoglycoside antibiotics. Biochemistry (Wash.) 13
(1974) 598-603
15. Chiu, V.S.W., Hoeprich, P.D.: Susceptibility of *Proteus*
and *Providencia* bacilli to 10 antibacterial agents. Am J
Med.Sci. 241 (1961) 309-321
16. Clarke, R.C., Morris, J.B.: Bactericin 7433: a bacteriocin
produced by *Flavobacterium dutkayii* NCTC 7433. J.Gen.Microbiol.
95 (1976) 67-77
17. Closs, G., Sigurdson, A.: Rapid identification of *Proteus*
species and *Providencia* by a simple two-step procedure. Acta
Path.Microbiol.Scand.Sect.B 81 (1973) 684-688
18. Coetsee, J.A.: Lysozymes in *Providencia* strains and the
host-range of *Providencia* bacteriophages. Nature 187 (1961)
518-519
19. Coetsee, J.A.: Host-range of *Proteus morganii* bacteriophages.
Nature 199 (1963) 827-828

31. Coetzee, J.N.: Transmission of colicinogeny to Providence strains. *Nature* 203 (1964) 897-898
32. Coetzee, J.N., Smit, J.A., Prozesky, O.W.: Properties of Providence and *Proteus morganii* transducing phages. *J.Gen. Microbiol.* 44 (1966) 167-176
33. Coetzee, J.N.: Bacteriocinogeny in strains of Providence and *Proteus morganii*. *Nature* 213 (1967) 614-616
34. Coetzee, H.J., de Klerk, H.C., Coetzee, J.N.: Bacteriophage-tail-like particles associated with intra-species killing of *Proteus vulgaris*. *J.Gen.Virol.* 2 (1968) 29-36
35. Coetzee, J.N.: Genetics of the *Proteus* group. *Ann.Rev. Microbiol.* 26 (1972) 23-54
36. Coetzee, J.N., Krizsanovich-Williams, K., Williams, J.A.: Cotransduction of morganocinogenic plasmid 174 and R-factor R 772. *J.Gen.Microbiol.* 100 (1977) 299-308
37. Cosenza, B.J., Podgwaite, J.D.: A new species of *Proteus* isolated from larvae of the gypsy moth *Porthetria dispar* (L.). *J.Microbiol.Serol.* 32 (1966) 187-191 (zit.nach (22))
38. Craddock, J.E., Traub, W.H.: Bacteriocinogeny in *Proteus rettgeri*. *Experientia* 27 (1971) 980
39. Craddock-Watson, J.E.: The production of bacteriocines by *Proteus* species. *Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.* 196 (1965) 385-388
40. Curreri, P.W., Bruck, H.M., Lindberg, R.B., Mason, A.D., Pruitt, B.A.: *Providencia stuartii* sepsis: a new challenge in the treatment of thermal injury. *Ann.Surg.* 177 (1973) 133-138
41. Dajani, A.S., Wannamaker, L.W.: Kinetic studies on the interaction of bacteriophage type 71 staphylococcal bacteriocin with susceptible bacteria. *J.Bacteriol.* 114 (1973) 738-742
42. Darrell, J.H., Wahba, A.H.: Pyocine-typing of hospital strains of *Pseudomonas pyocyanea*. *J.Clin.Pathol.* 17 (1964) 236-242

43. Dastidar, S.G., Mitra, S., Sarkar, S.N., Chakrabarty, A.N.: Transformation with bacteriocin factors in Staphylococci. J.Gen.Microbiol. 84 (1974) 245-252
44. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B.: Microbiology. 2nd edition. Harper and Row, Hagerstown, Maryland, 1973
45. Dimitracopoulos, G., Tsannetis, S., Papavassiliou, J.: Bacteriocinogeny in Proteus-species. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt. Orig.A 222 (1972) 227-231
46. Donoghue, H.D.: Properties and comparative starch-gel electrophoresis of megacins from several Bacillus megaterium strains. J.Gen.Microbiol. 72 (1972) 473-483
47. Drasar, F.A., Farrell, W., Maskell, J., Williams, J.D.: Tobramycin, amikacin, sisomycin and gentamicin resistant gram-negative rods. British Med.J. 2 (1976) 1284-1287
48. Duncan, J.B.R., Penner, J.L.: Comparative activity of tobramycin and gentamicin against Pseudomonas, Proteus and Providencia species. Canadian Med.Assoc.J. 113 (1975) 29-31
49. Dutton, A.A.C., Ralston, M.: Urinary tract infection in a male urological ward. Lancet 1 (1957) 115-119
50. Ederer, G.M., Chu, J.H., Blazevic, D.J.: Rapid test for urease and phenylalanine deaminase production. Appl.Microbiol. 21 (1971) 545
51. Edwards, P.R., Ewing, W.H.: Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publ.Comp., Minneapolis, 1972
52. Eichenlaub, R., Winkler, U.: Purification and mode of action of two bacteriocins produced by Serratia marcescens HY. J.Gen.Microbiol. 83 (1974) 83-94
53. Ewing, W.H., Tanner, K.E., Dennard, D.A.: The Providence group: an intermediate group of enteric bacteria. J.Infect. Dis. 94 (1954) 134-140 (zit.nach (51))

54. Ewing, W.H.: The nomenclature of the *Proteus* and *Providencia* groups. *Int.Bull.Bacteriol.Nomencl.Taxon.* 8 (1958) 17-22 (zit.nach (35))
55. Ewing, W.H.: The tribe *Proteae*: its nomenclature and taxonomy. *Int.Bull.Bacteriol.Nomencl.Taxon.* 12 (1962) 93-102 (zit.nach (35))
56. Farmer III, J.J., Herman, L.G.: Epidemiological fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by the production of and sensitivity to pyocin and bacteriophage. *Appl.Microbiol.* 18 (1969) 760-765
57. Farmer III, J.J.: Epidemiological differentiation of *Serratia marcescens*: typing by bacteriocin production. *Appl.Microbiol.* 23 (1972) 218-225
58. Farmer III, J.J.: Epidemiological differentiation of *Serratia marcescens*: typing by bacteriocin sensitivity. *Appl.Microbiol.* 23 (1972) 226-231
59. Farmer III, J.J., Hickman, F.W., Brenner, D.J., Schreiber, M., Rickenbach, D.G.: Unusual *Enterobacteriaceae*: "*Proteus rettgeri*" that "change" into *Providencia stuartii*. *J.Clin. Microbiol.* 6 (1977) 373-378
60. Fields, B.N., Uwaydah, M.M., Kunz, L.J.: The so-called "Paracolon" bacteria. *Am.J.Med.* 42 (1967) 89 ff.
61. Foulds, J.: Mode of action of a bacteriocin from *Serratia marcescens*. *J.Bacteriol.* 107 (1971) 833-839
62. Foulds, J.: Purification and partial characterization of a bacteriocin from *Serratia marcescens*. *J.Bacteriol.* 110 (1972) 1001-1009
63. Foulds, J., Barrett, C.: Characterization of *E.coli* mutants tolerant to bacteriocin JF 246: two new classes of tolerant mutants. *J.Bacteriol.* 116 (1973) 885-892

64. Frédéricq, P.: Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. Rev.Belge Path.Med.Exp. 29 Suppl. 4 (1948) 1-107 (zit. nach (141))
65. Fritsche, D., Dostal, C., Spieckermann, C.: Die Untersuchung des epidemiologischen Verhaltens von *Serratia marcescens* mit Hilfe der Bacteriocin-Typisierung. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt. Orig.A 223 (1973) 513-519
66. George, R.H.: Comparison of different media for bacteriocine typing of *Proteus mirabilis*. J.Clin.Pathol. 28 (1974) 25-28
67. Gillies, R.R.: Colicine production as an epidemiological marker of *Shigella sonnei*. J.Hyg. (Cambr.) 62 (1964) 1-9
68. Gillies, R.R., Govan, J.R.W.: Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production. J.Pathol.Bacteriol. 91 (1966) 339-345
69. Gissmann, L., Lotz, W.: Unempfindlichkeit defekt lysogener *Rhizobium lupini*-Stämme gegenüber homologen Phagen-ähnlichen Bacteriocinen. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 228 (1974) 183-184
70. Govan, J.R.W., Gillies, R.R.: Further studies in the pyocine typing of *Pseudomonas pyocyanea*. J.Med.Microbiol. 2 (1969) 17-25
71. von Graevenitz, A., Nourbakhsh: Antimicrobial resistance of the genera *Proteus*, *Providencia* and *Serratia* with special reference to multiple resistance patterns. Med.Microbiol. Immunol. 157 (1972) 142-148
72. Gratia, A.: Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. Comptes rendus soc.Biol. 93 (1925) 1040-1041 (zit.nach (20))
73. Gratia, A., Frédéricq, P.: Diversité des souches antibiotiques de *B.coli* et étendue variable de leur champ d'action. Comptes rendus soc.Biol. 140 (1946) 1032-1033 (zit.nach (20))
74. Groß, R., Schölmerich, P.: Lehrbuch der Inneren Medizin. 5. Auflage. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1977

75. Guest, J.R.: Bacteriocinogeny in the Athiorhodaceae.
J.Gen.Microbiol. 81 (1974) 513-515
76. Halliwell, G., Sweet, C.: Bacteriocinogenic activity in the
genus *Cellvibrio*. J.Gen.Microbiol. 77 (1973) 363-369
77. Hamilton-Miller, J.M.T., Reynolds, A.V., Brumfitt, W.:
Apparent emergence of gentamicin-resistant *Providencia*
stuartii during therapy with gentamicin. Lancet 2 (1974) 527
78. Hamon, Y., Péron, Y.: Les bactériocines, éléments taxonomiques
éventuels pour certaines bactéries. Comptes rendus Acad.Sci.
254 (1962) 2868-2870 (zit.nach (141))
79. Hamon, Y., Péron, Y.: Individualisation de quelques nouvelles
familles d'enterobactériocines. Comptes rendus Acad.Sci. 257
(1963) 309-311 (zit.nach (141))
80. Hamon, Y., Péron, Y.: Etude d'une souche bactériocinogène
et lysogène d'*Enterobacter aerogenes*. Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.
203 (1967) 184-189
81. Hardy, K.G.: Colicinogeny and related phenomena. Bact.Rev.39
(1976) 464-515
82. Hardy, K.G.: Bacteriocins: In: Bull, A.T., Meadow, P.M. (ed.):
Companion to microbiology. Longman, London-New York, 1978
83. Hedges, R.W.: R-factors from Providence. J.Gen.Microbiol. 81
(1974) 171-181
84. Hellinger, B.: Ein neuer Weg zur Typisierung von *Proteus*
rettgeri. Inauguraldissertation, München 1977
85. Hill, L.R.: An index of desoxyribonucleic acid base compositions
of bacterial species. J.Gen.Microbiol. 44 (1966) 419-437
86. JCSB subcommittee on taxonomy of Enterobacteriaceae: Some
taxonomic recommendations and a proposal of neotype strains
for nineteen species of Enterobacteriaceae. Int.J.Syst.Bacteriol.
29 (1979) 38-41

87. Ivanovics, G.: Bacteriocins and bacteriocin-like substances. Bact.Rev.26 (1962) 108-118
88. Jacob, F., Siminovitch, L., Wollman, E.L.: Comparaison entre la biosynthèse induite de la colicine et des bactériophages et entre leur mode d'action. Ann.Inst.Pasteur 84 (1953) 313-318
89. Jacob, A.E., Douglas, G.J., Hobbs, S.J.: Self-transferable plasmids determining the hemolysin and bacteriocin of *Streptococcus faecalis* var.zymogenes. J.Bacteriol. 121 (1975) 863-872
90. Janis, B., Evans, R.G., Hoeprich, P.D.: Providence bacillus bacteremia and septicopyemia. Am.J.Med. 45 (1968) 943-947
91. Kuaffmann, F.: Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, 1951 (zit. nach (35))
92. Kauffmann, F., Edwards, P.R.: On the classification and nomenclature of Enterobacteriaceae. Intern.Bull.Bacteriol. Nomencl.Taxon. 2 (1952) 2-8 (zit.nach (35))
93. Keane, C.T., English, L.F., Wise, R.: Providencia stuartii infections. Lancet 2 (1975) 1045
94. Klastersky, J., Bogaerts, A.M., Noterman, J.: Infections caused by Providence bacilli. Scand.J.Infect.Dis. 6 (1974) 153-160
95. de Klerk, H.C., Smit, J.A.: Properties of a Lactobacillus fermenti bacteriocin. J.Gen.Microbiol. 48 (1967) 309-316
96. Knapp, J.S., Falkow, S., Holmes, K.K.: Reevaluation of bacteriocinogeny in Neisseria gonorrhoeae. J.Clin.Pathol. 28 (1975) 274-278
97. Kopf, P.O., Freitag, V.: Krankenhausinfektionen mit Providencia stuartii. Deutsche Medizinische Wochenschrift 104 (1979) 1129-1132

98. Krämer, J., Brandis, H.: Purification and characterization of two bacteriocins from *Streptococcus faecium*. J.Gen. Microbiol. 88 (1975) 93-100
99. Krämer, J., Brandis, H.: Mode of action of two *Streptococcus faecium* bacteriocins. Antimicrobial Agents Chemotherapy 7 (1975) 117-120
100. Krämer, J., Lenz, W.: Vergleichende Untersuchungen über einen temperenten Phagen und Bacteriocine von *Streptococcus faecium*. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 231 (1975) 421-425
101. Küchler, R.: Vergleichende Pyocin-Typisierung von *Pseudomonas aeruginosa* mit verschiedenen Indikatorsätzen. Zbl.Bakt.Hyg. I.Abt.Orig.A 234 (1976) 202-211
102. Lennette, E.H., Spaulding, E.H., Truant, J.P.: Manual of clinical microbiology. 2nd Edition. American society for Microbiology, Washington, D.C., 1974
103. Li, K., Miller, C.: Pathogenic bacteria and their sensitivity patterns in a hospital population of geriatric patients with chronic disease. J.Am.Geriatr.Soc. 18 (1970) 286-294
104. Linton, K.B.: The colicine typing of coliform bacilli in the study of cross-infection in urology. J.Clin.Pathol. 13 (1960) 168-172
105. Machtiger, N.A., O'Leary, W.M.: Nutritional requirements of Arizona, *Citrobacter* and *Providencia*. J.Bacteriol. 108 (1971) 948-950
106. Magaña-Plaza, J., Ruiz-Herrera: Mechanisms of regulation of urease biosynthesis in *Proteus rettgeri*. J.Bacteriol. 93 (1967) 1294-1301
107. Marengo, P.B., Chenoweth, M.E., Overturf, G.D., Wilkins, J.: Phosphorylation of kanamycin, lividomycin A and butirosin B by *Providencia stuartii*. Antimicrobial Agents Chemotherapy 6 (1974) 821-824

108. Matsuo, Y., Utsunomiya, S.: Bacteriocinogeny in the genus *Lactobacillus*. *Hiroshima J.Med.Sci.* 24 (1975) 59-63
109. McGeachie, J., McCormick, W.: Comparison of colicine production and diffusion on different solid media. *J.Clin. Pathol.* 16 (1963) 278-280
110. McGeachie, J.: Bacteriocin typing in urinary infection. *Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.* 196 (1965) 377-384
111. McGeachie, J., McCormick, W.: Importance of potency in typing by colicine production. *J.Clin.Pathol.* 20 (1967) 887-891
112. McHale, P., English, L., Speekenbrink, A., Keane, C., Wise, R.: Kanamycin resistance in *Providencia stuartii*. *J.Antimicrobial Chemotherapy* 4 (1978) 273-278
113. Middleton, J.E.: The sensitivity in vitro of the Providence group of enteric bacteria to 14 antibiotics and nitrofurantoin. *J.Clin.Pathol.* 11 (1958) 270-272
114. Milner, P.F.: The differentiation of Enterobacteriaceae infecting the urinary tract. *J.Clin.Pathol.* 16 (1963) 39-45
115. Milstoc, M., Steinberg, P.: Fatal septicemia due to Providence group bacilli. *J.Am.Geriatr.Soc.* 21 (1973) 159-163
116. Monto, A.S., Rantz, L.A.: Classification of so-called paracolon bacilli isolated from urinary tract infection. *J. Laboratory and Clinical Medicine* 65 (1965) 64-70
117. Morris, A.H.: Nebulizer contamination in a burn unit. *Am.Rev.Resp.Dis.* 107 (1973) 802-808
118. Müller, U., Brühl, P.: Zur antibiotischen Aktivität von Gentamycin bei mehrfachresistenten *Providenciastämmen*. *Therapie der Gegenwart* 107 (1968) 168-172
119. Namioka, S., Sakazaki, R.: Etude sur les *Rettgerella*. *Ann.Inst.Pasteur.* 94 (1958) 485-499

120. Naumann, P.: Moderner Hospitalismus. Zbl. für Chirurgie 101 (1976) 449-457
121. Nomura, M.: Colicins and related bacteriocins. Ann.Rev. Microbiol. 21 (1967) 257-284
122. Ohkawa, J., Maruo, B., Kageyama, M.: Preferential inhibition of lipid synthesis by the bacteriocin pyocin S 2. J.Biochemistry (Tokyo) 78 (1975) 213-223
123. Ornstein, M.: Zur Bakteriologie des Schmitzbacillus. Z.Hyg.Inf.kr. 91 (1921) 152-178 (zit.nach (158))
124. Ortel, S.: Untersuchungen über Monocine. Zbl.Bakt.Hyg.I. Abt.Orig. A 242 (1978) 72-78
125. Osman, M.A.M.: Pyocine typing of *Pseudomonas aeruginosa*. J.Clin.Pathol.18 (1965) 200-202
126. Overturf, G.D., Wilkins, J., Ressler, R.: Emergence of resistance of *Providencia stuartii* to multiple antibiotics: speciation and biochemical characterization of *Providencia*. J.Infect.Dis. 129 (1974) 353-357
127. Overturf, G.D., Zawacki, B.E., Wilkins, J.: Emergence of resistance to amikacin during treatment of burn wounds: the role of antimicrobial susceptibility testing. Surgery 79 (1976) 224-228
128. Penner, J.L., Hinton, N.A., Hennessy, J.N.: Biochemical differentiation of *Proteus rettgeri*. J.Clin.Microbiol. 1 (1975) 136-142
129. Penner, J.L., Hinton, N.A., Hennessy, J.N., Whiteley, G.R.: Reconstitution of the somatic (O-)antigenic scheme for *Providencia* and preparation of O-typing antisera. J.Infect. Dis. 133 (1976) 283-292
130. Penner, J.L., Hinton, N.A., Whiteley, G.R., Hennessy, J.N.: Variation in urease activity of endemic hospital strains of *Proteus rettgeri* and *Providencia stuartii*. J.Infect.Dis. 134 (1976) 370-376

131. Penner, J.L., Hennessy, J.N.: Reassignment of the intermediate strains of *Proteus rettgeri* biovar 5 to *Providencia stuartii* on the basis of the somatic (O-) antigens. Intern.J.Syst.Bacteriol. 27 (1977) 71-74
132. Penner, J.L., Whiteley, G.R.: Cross protection of mice provided by active and passive immunization against experimental infections with virulent *Proteus rettgeri* and *Providencia bacteria*. Infection and Immunity 20 (1978) 347-351
133. Penner, J.L., Hinton, N.A., Duncan, J.B.R., Hennessy, J.N., Whiteley, G.R.: O-serotyping of *Providencia stuartii* isolates collected from twelve hospitals. J.Clin.Microbiol. 9 (1979) 11-14
134. Penner, J.L., Fleming, P.C., Whiteley, G.R., Hennessy, J.N.: O-serotyping *Providencia alcalifaciens*. J.Clin.Microbiol. 10 (1979) 761-765
135. Penner, J.L., Hennessy, J.N.: Application of O-serotyping in a study of *Providencia rettgeri* (*Proteus rettgeri*) isolated from human and nonhuman sources. J.Clin.Microbiol. 10 (1979) 834-840
136. Plate, C.A., Luria, S.E.: Stages in colicin K action, as revealed by the action of trypsin. Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69 (1972) 2030-2034
137. Podhaisky, C., Reinhold, L.: Bacteriocinbildung und Bacteriocinsensibilität bei *Bacteroides fragilis* und *Bacteroides thetaiotamicron* aus klinischem Material. Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. 215 (1970) 475-482
138. Prozesky, O.W., Grabow, W.O.K., van der Merwe, S., Coetzee, J.N.: Arginine gene clusters in the *Proteus-Providencia* group. J.Gen. Microbiol. 77 (1973) 237-240
139. Ramadan, F.M.: *Providencia* measuring in a well water sample. J.Hyg.Epidemiol. (Praha) 16 (1972) 173-178

140. Rauss, K.: A proposal for the nomenclature and classification of the *Proteus* and *Providencia* groups. *Int.Bull.Bacteriol. Nomencl.Taxon.* 12 (1962) 53-63 (zit.nach (35))
141. Reeves, P.: The bacteriocins. *Bact.Rev.* 29 (1965) 24-45
142. Reeves, P.: The bacteriocins. Springer Verlag, Berlin, 1972
143. Report 1963. - *Intern.Bull.Bacteriol.Nomencl.Taxon.* 13 (1963) 85-90 (zit.nach (35))
144. Reynolds, A.V., Hamilton-Miller, J.M.T., Brumfitt, W.: Newer aminoglycosides-amikacin and tobramycin: an in vitro comparison with kanamycin and gentamicin. *British Med. J.* 3 (1974) 778-780
145. Richard, C.: Caractères biochimiques des biotypes de *Providencia*; leurs rapports avec le genre *Reitterella*. *Ann.Inst.Pasteur* 110 (1966) 105-114
146. Rogers, A.H.: Bacteriocin types of *Streptococcus mutans* in human mouths. *Arch.Oral Biol.* 20 (1975) 853-858
147. van Ros, G.: The *Providencia*, *Enterobacteria* considered to be potential pathogens. Strains and cases, studied in Leopoldville in the Congo. *Bull.soc.path.exot.* 58 (1965) 714-728
148. Rosin, H., Naumann, P., Reintjens, E., Kochler, M.: Comparative evaluation of five aminoglycosides for treatment. *Int.J.Clin.Pharmacol.Biopharm.* 13 (1976) 157-167
149. Ryan, F.J., Fried, P., Mukai, F.: A colicin produced by cells that are sensitive to it. *Biochimica et biophysica Acta* 18 (1955) 131
150. Sabet, S.F., Schnaitman, C.A.: Localization and solubilization of colicin receptors. *J.Bacteriol.* 108 (1971) 422-430
151. Schallehn, G.: Bacteriocine von *Clostridium septicum*. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A* 233 (1975) 542-552

152. Schlegel, R., Slade, H.D.: Bacteriocin production by transformable group H Streptococci. J.Bacteriol. 112 (1972) 824-829
153. Schlegel, R., Slade, H.D.: Alteration of macromolecular synthesis and membrane permeability by a Streptococcus sanguis bacteriocin. J.Gen.Microbiol. 81 (1974) 275-277
154. Schmitt, G., Neussel, H.: Chemotherapie von Harnwegsinfektionen durch Providencia bei postoperativ bestrahlten Blasenkarzinomen. Med.Monatsschrift 24 (1970), 462-465
155. Schwinghamer, E.A.: Properties of some bacteriocins produced by Rhizobium trifolii. J.Gen.Microbiol. 91 (1975) 403-413
156. Sedlák, J., Mulczyk, M., Slopek, S., Slajsová, M.: Über die Bakteriocine der Gattung Citrobacter. Zbl.Bakt. I.Abt.Orig. 202 (1967) 448-462
157. Senior, B.W.: Typing of Proteus strains by proticine production and sensivity. J.Med.Microbiol. 10 (1977) 7-17
158. Shaw, C., Clarke, P.H.: Biochemical classification of Proteus and Providence cultures. J.Gen.Microbiol. 13 (1955) 155-161
159. Singer, J., Bar-Chay, J.: Biochemical investigation of Providence strains and their relationship to the Proteus group. J.Hyg. (Cambr.) 52 (1954) 1-8
160. Smarda, J., Taubeneck, U.: Situation of colicin receptors in surface layers of bacterial cells. J.Gen.Microbiol. 52 (1968) 161-172
161. Smit, J.A., de Klerk, H.C., Coetzee, J.N.: Properties of a Proteus morganii bacteriocin. J.Gen.Microbiol. 54 (1968) 67-75
162. Smit, J.A., Hugo, N., de Klerk, H.C.: A receptor for a Proteus vulgaris bacteriocin. J.Gen.Virol. 5 (1969) 33-37

163. Smit, J.A., Stocken, L.A., de Klerk, H.C.: A receptor for *Proteus morganii* bacteriocin 336. *J.Gen.Microbiol.* 65 (1971) 249-251
164. Solberg, C.O., Matsen, J.M.: Infections with *Providencia* bacilli. *Am.J.Med.* 50 (1971) 241-246
165. Starkey, D.H.: Serotyping and R-factor analysis of *Providencia* as aids to hospital infection surveillance. Paper delivered to Infection Control Group, Montreal, Oct. 1974
166. Stenzel, W.: *Proteus inconstans* O13 H30 als Enteritis-Erreger bei Kleinkindern. *Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.* 182 (1961) 178-183
167. Stickler, D.J., Thomas, B.: Sensivity of *Providencia* to antiseptics and disinfectants. *J.Clin.Pathol.* 29 (1976) 815-823
168. Straube, W., Brühl, P.: Über Antibiotikaresistenz - Die Bedeutung der Mehrfachresistenz bei Harnwegsinfektionen. *Münchener Med.Wochenschrift* 109 (1967) 1473-1478
169. Stuart, C.A., Wheeler, K.N., Rustigian, R., Zimmerman, A.: Biochemical and antigenetic relationships of the paracolon bacteria. *J.Bacteriol.* 45 (1943) 101-119 (zit.nach (35))
170. Takahashi, N.: Purification and partial characterization of a bacteriocin from *Serratia marcescens*. *Jap.J.Bacteriol.* 28 (1973) 225-230
171. Tomaschoff, E.: Die Ökologie und Bedeutung der *Proteus*-gruppe. *Klin.Wochenschrift* 47 (1969) 837-844
172. Tracy, O., Thomson, E.J.: An evaluation of three methods of typing organisms of the genus *Proteus*. *J.Clin.Pathol.* 25 (1972) 69-72
173. Traub, W.H., Paymond, E.A., Startzman, T.S.: Bacteriocin (marcescin) typing of clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Appl.Microbiol.* 21 (1971) 837-840

174. Traub, W.H.: Studies on group A bacteriocins of *Serratia marcescens*: Preliminary characterization of two subgroups of bacteriocins. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A* 222 (1972) 232-244
175. Traub, W.H., Kleber, J.: Studies on group A (phage tail) bacteriocins of *Serratia marcescens*: I. Phenotypic variation of producer and indicator strains. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A* 225 (1973) 296-304
176. Traub, W.H., Acker, G., Kleber, J.: Studies on phage tail bacteriocins of *Proteus rettgeri*. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A* 229 (1974) 362-371
177. Traub, W.H., Kleber, J.: Studies on group A (phage tail) bacteriocins of *Serratia marcescens*: III. Inhibition of β -Galactosidase-activity (ONPG-hydrolysis) in sensitive indicator cells. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A* 229 (1974) 482-489
178. Traub, W.H., Kleber, J.: Studies on group A (phage tail) bacteriocins of *Serratia marcescens*: IV. Preliminary characterization of receptors of subgroup II bacteriocines. *Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A* 229 (1974) 490-502
179. Ursing, J.: Biochemical study of *Proteus inconstans* (Providencia). *Acta Pathol. Microbiol.Scand.Sect.B* 82 (1974) 527-532
180. Vassiliadis, P., Politi, G.: Milieu combiné pour la recherche de l'uréase et la transformation de la L-phénylalanine en acide phénylpyruvique. *Ann.Inst.Pasteur* 114 (1968) 431-435
181. Wahba, A.H.: The production and inactivation of pyocines. *J.Hyg. (Cambr.)* 61 (1963) 431-441
182. Washington, J.A., Senjem, D.H., Haldorson, A., Schutt, A.H., Martin, W.J.: Nosocomially acquired bacteriuria due to *Proteus rettgeri* and *Providencia stuartii*. *Am.J.Clin. Pathol.* 60 (1973) 836-838

183. Wegener, H.P.: Antibiose bei Enterobakterien und ihre Wechselwirkungen mit Chemotherapeutika. Inaugural-dissertation, München, 1977
184. Wenzel, R.P., Hunting, K.J., Osterman, C.A., Sande, M.A.: *Providencia stuartii*, a hospital pathogen: potential factors for its emergence and transmission. *Am.J. Epidemiol.* 104 (1976) 170-180
185. Whiteley, G.R., Penner, J.L., Stewart, J.O., Stokan, P.C., Hinton, N.A.: Nosocomial urinary tract infections caused by two O-serotypes of *Providencia stuartii* in one hospital. *J.Clin.Microbiol.* 6 (1977) 551-554
186. Williams, J.A.: Mobilization of morganocin 174 plasmid and kinetics of morganocin production in *Proteus* and *Escherichia coli* hosts. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 11 (1977) 514-520
187. Williams, J.A., Krizsanovich-Williams, K.: Mode of action of morganocin 174. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 12 (1977) 395-400
188. Yamamoto, T., Imai, S., Nisizawa, J., Araya, S.: Production of and susceptibility to bacteriocin like substances in oral streptococci. *Arch.Oral Biol.* 20 (1975) 389-391

7. LEBENSLAUF

Ich kam am 14.4.1955 in Memmingen/Allgäu als das erste von drei Kindern der Eheleute Dr. Franz Schötz und Anna Schötz, geborene Huber, zur Welt. - Mein Vater arbeitet am Botanischen Garten in München, derzeit als Leitender Sammlungsdirektor, daneben lehrt er als außerplanmäßiger Professor für Botanik an der Universität München. Meine Mutter war bis 1955 als Studienrätin für Biologie, Chemie und Erdkunde tätig, ist seitdem Hausfrau.

1955 übersiedelte ich nach München. Die Volksschule besuchte ich von 1961-1965, von 1965-1974 das Wittelsbacher Gymnasium in München, wo ich am Neusprachlichen Zweig die Reifeprüfung ablegte. Von 1974-1980 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Humanmedizin und Philosophie. Ich erhielt hierfür Mittel nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz. Die Ärztliche Prüfung schloß ich im Oktober 1980 ab und erhielt darauf die Approbation als Arzt.

Seit dem 1.1.1981 bin ich als Assistenzarzt an der Psychiatrischen Abteilung des Bezirkskrankenhauses Gabersee bei Wasserburg am Inn tätig.

Josef Schötz

